

Avaliação dos mecanismos de suscetibilidade de diferentes cultivares de *Actinidia* spp. ao cancro bacteriano do kiwi

Pedro Emanuel Alves Brás

Mestrado em Engenharia Agronómica

Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território
2017

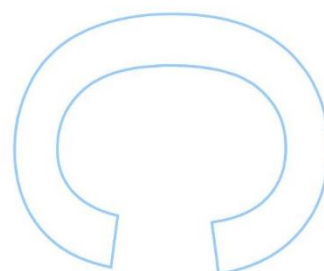
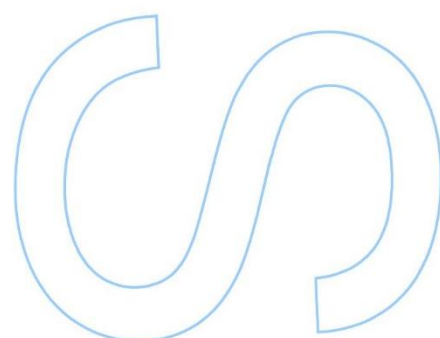
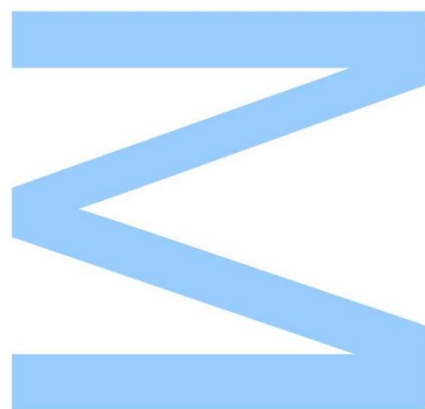
Orientador

Prof. Doutora Susana Maria Pinto de Carvalho; FCUP

Coorientadores

Doutora Marta Wilton Vasconcelos; ESB-UCP

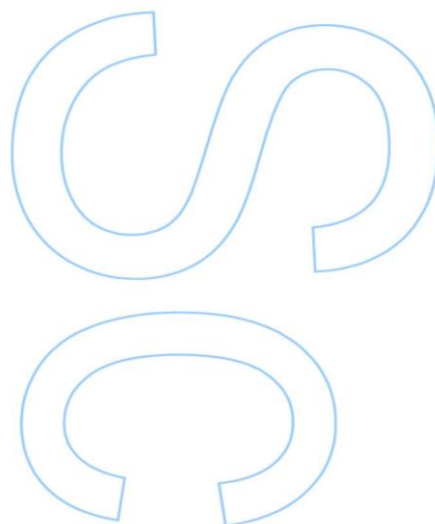
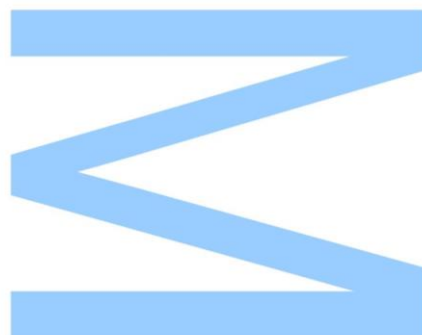
Mestre Marta Nunes da Silva; FCUP e ESB-UCP



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Ao entregar este trabalho, é com o maior prazer que agradeço a todos os que de alguma forma contribuíram para a sua realização.

Em primeiro lugar aos meus orientadores, Professora Doutora Susana Maria Pinto de Carvalho, Mestre Marta Nunes da Silva e Doutora Marta Wilton Vasconcelos, pela grande ajuda ao longo do trabalho laboratorial e escrito, disponibilidade, incentivo e amizade demonstrada.

À minha família e amigos pelo apoio, paciência e amizade ao longo de todos os anos do curso e sem os quais nunca teria realizado este trabalho.

Resumo

A *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) é a bactéria causadora da doença conhecida como o cancro bacteriano do kiwi (CBK), sendo responsável por graves perdas económicas para a cultura de kiwi em todo o mundo. Os sintomas desta doença variam desde o aparecimento de manchas foliares, formação de cancrios nos ramos e tronco e libertação de exsudados bacterianos. Uma outra estirpe bacteriana geneticamente idêntica à PSA, a *P. syringae* pv. *actinidifoliorum* (PFM), foi também isolada de plantas de kiwi com alguns sintomas foliares; no entanto, ao contrário da PSA, a PFM não causa a mortalidade da planta. Não há ainda muita informação sobre estas bactérias, nomeadamente no que diz respeito à etiologia da doença, mas sabe-se que estas são capazes de penetrar na planta através de feridas naturais ou artificiais, tendo capacidade de se movimentar através do sistema vascular. Dada a severidade dos sintomas do CBK, a sua elevada capacidade de dispersão e a inexistência de meios de controlo eficientes e sustentáveis, é imperativo compreender o porquê da elevada suscetibilidade de determinadas cultivares de kiwi à doença, quais os mecanismos fisiológicos e genómicos envolvidos na defesa as plantas contra o patogénio e o impacto da infeção por estirpes bacterianas com graus de virulência diferentes. Neste contexto, foram levadas a cabo dois ensaios por forma a compreender: 1) quais os genes envolvidos na defesa de plantas de kiwi contra duas estirpes de *Pseudomonas syringae* com virulência contrastante inoculadas em duas densidades distintas e 2) quais os metabolitos de defesa sintetizados por duas cultivares de kiwi com diferentes suscetibilidades à doença após inoculação com uma elevada densidade de inóculo bacteriano.

No ensaio 1 foi analisada a sensibilidade de duas espécies de plantas de kiwi à PSA e PFM, tendo sido selecionada uma cultivar representativa de cada uma das espécies: 'Hayward' (*Actinidia deliciosa*) e 'Ken's Red' (*A. arguta*). As plantas foram inoculadas artificialmente com uma de duas densidades de inóculo de cada uma das estirpes bacterianas (PSA e PFM), um com baixa densidade de inóculo e outro com elevada alta densidade de inóculo. O desenvolvimento da doença foi monitorizado um e dois dias pós inoculação (dpi) através da determinação das unidades formadoras de colónias (UFC) e análise de expressão genética de genes relacionados com a defesa da planta (*APX*, *CAT*, *SOD*, *LOX1*, *SAM* e *TLP1*). No ensaio 2, plantas *in vitro* de *A. deliciosa* cv. 'Hayward' e de *A. arguta* cv. 'Ken's Red' foram infetadas artificialmente com uma densidade elevada de inóculo de PSA ou PFM e foram realizadas amostragens destrutivas um e dois dpi, após as quais se determinou vários compostos envolvidos na

capacidade de defesa das plantas (fenólicos solúveis totais, lenhina, flavonoides e enzimas antioxidantes). No final do período experimental (2 dpi) as plantas 'Hayward' apresentaram UFC 19,4 e 29,5 vezes superior às 'Ken's Red' , após inoculação com elevada densidade de PSA e PFM, respetivamente. Após inoculação com baixa densidade de inóculo, as plantas 'Hayward' apresentaram UFC 6,9 vezes superior para a PSA, comparativamente com 'Ken's Red', enquanto que não se detetou PFM nos tecidos das plantas durante o período experimental. A expressão dos genes *CAT* e *APX*, codificadores das enzimas antioxidantes catalase e ascorbato peroxidase, sofreu uma regulação positiva em 'Ken's Red', enquanto que em 'Hayward' o gene *SOD*, o qual codifica a enzima superóxido dismutase, apresentou o maior aumento de expressão. Os genes *LOX1* e *SAM*, envolvidos na biossíntese de ácido jasmónico e etileno, respetivamente, aumentaram até 2 dpi em 'Hayward' e 1 dpi em 'Ken's Red' para densidades baixas de inóculo, enquanto que com densidades elevadas houve um aumento gradual em ambas as cultivares até 2 dpi. Entre os metabolitos analisados em plantas inoculadas com uma elevada densidade bacteriana, os compostos fenólicos aparentam ter um papel importante na maior tolerância à PSA, apresentando maiores concentrações em plantas inoculadas com PSA, em comparação com a PFM. Estes resultados demonstram que 'Ken's Red' parece ser muito mais tolerante do que 'Hayward' à PSA e PFM e que os mecanismos de resistência entre as duas espécies envolvem vias de defesa específicas a serem desencadeadas em momentos distintos após a infeção da planta.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes, expressão de genes, metabolitos secundários, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum*, suscetibilidade, tolerância, UFC.

Summary

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* (PSA), the bacterium that causes the disease known as kiwifruit bacterial canker (KBC), is responsible for severe economic losses in kiwifruit production worldwide. Disease symptoms range from the appearance of leaf spots, cancer formation in tree branches and trunk and the release of bacterial exudates. Another bacterial strain genetically identical to PSA, *P. syringae* pv. *actinidifoliorum* (PFM), was also isolated from kiwifruit plants with some foliar symptoms; however, unlike PSA, PFM does not cause plant mortality. So far, few information about these bacteria has been made available, particularly regarding to the etiology of the disease, but it is known that these bacteria are able to penetrate plant tissues through natural wounds or pruning cuts, being able to move through the vascular system. Given the severity of KBC symptoms, its high dispersion capacity and the lack of efficient and sustainable control methods, it is imperative to understand the high susceptibility of certain kiwifruit cultivars to the disease, the physiological and genomic mechanisms involved in plant defense against the pathogen and the impact of the infection by bacterial strains with different degrees of virulence. In this context, two trials were carried out to understand: 1) which genes are involved in the defense of kiwifruit plants against two strains of *Pseudomonas syringae* with contrasting virulence inoculated at two distinct densities and 2) which defense metabolites are synthesized by two kiwifruit cultivars with different susceptibility to the disease after inoculation with a high density of bacterial inoculum.

In Experiment 1 the sensitivity to PSA and PFM of two species of kiwifruit plants was analyzed, and a representative cultivar of each species was selected: 'Hayward' (*Actinidia deliciosa*) and 'Ken's Red' (*A. arguta*). Plants were artificially inoculated with one of two inoculum densities of each bacterial strain, a low density inoculum and a high density inoculum. The development of the disease was monitored one and two days post inoculation (dpi) by determination of colony forming units (CFU) and analysis of gene expression of plant defense-related genes (*APX*, *CAT*, *SOD*, *LOX1*, *SAM* and *TLP1*). In Experiment 2, *in vitro* plants of *A. deliciosa* cv. 'Hayward' and *A. arguta* cv. 'Ken's Red' were artificially infected with a high density inoculum of PSA or PFM, and 1 and 2 dpi destructive sampling was performed, after which several compounds involved in plant defense capacity (total soluble phenolic compounds, lignin, flavonoids and antioxidant enzymes) were quantified. At the end of the experimental period (2 dpi) 'Hayward' plants presented CFU values 19.4- and 29.5-fold higher than 'Ken's Red', after inoculation with high density of PSA and PFM, respectively. After inoculation with low density inoculum, 'Hayward' plants presented 6.9-fold higher CFU levels for PSA, compared to 'Ken's Red',

whereas no PFM was detected in plant tissues during the experimental period. The expression of *CAT* and *APX* genes, which encode the antioxidant enzymes catalase and ascorbate peroxidase, underwent a positive regulation in 'Ken's Red', whereas in 'Hayward' *SOD* gene, responsible for the codification of superoxide dismutase, presented greater expression increase. The expression of *LOX1* and *SAM* genes, involved in the biosynthesis of jasmonic acid and ethylene, respectively, increased up to 2 dpi in 'Hayward' and 1 dpi in 'Ken's Red' for lower inoculum densities, whereas with high bacterial densities the relative expression of these genes increased up to 2 dpi. Among the metabolites analyzed in plants inoculated with a high bacterial density, the phenolic compounds appeared to play an important role in increased tolerance to PSA, presenting higher concentrations in plants inoculated with PSA, compared to PFM. These results demonstrate that 'Ken's Red' appears to be much more tolerant to PSA than 'Hayward' and that the resistance mechanisms between the two species involve specific defense pathways being triggered at distinct moments after plant infection.

Keywords: Antioxidant enzymes, CFU, gene expression, phenolics, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum*, secondary metabolites, susceptibility, tolerance.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Summary	III
1. Introdução	1
1.1. A produção do kiwi a nível mundial e nacional	2
1.2. Enquadramento histórico e geográfico da doença.....	4
1.3. Impacto económico da doença	6
1.4. Taxonomia e diferentes populações da PSA	7
1.5. Ciclo da doença	8
1.6. Sintomas	9
1.7. Controlo da doença	11
1.7.1. Meios culturais	12
1.7.2. Meios biológicos	13
1.7.3. Meios químicos	13
1.8. Resposta fisiológica, bioquímica e molecular à infeção	15
2. Objetivos do trabalho	18
3. Material e métodos.....	19
3.1. Material vegetal e delineamento experimental.....	19
3.1.1. Ensaio I – Influência da densidade do inóculo na severidade da doença	19
3.1.2. Ensaio II – Avaliação dos mecanismos de defesa contra a PSA	20
3.2. Manutenção da cultura bacteriana e preparação do inóculo	20
3.3. Inoculação das plantas e determinação de unidades formadoras de colónias (UFC).....	20
3.4. Extração de ácido ribonucleico (ARN)	21
3.5. Síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cADN) e análise de genes por qRT-PCR	21
3.6. Quantificação de Clorofilas	22
3.7. Quantificação de enzimas antioxidantes.....	22
3.7.1. Ascorbato peroxidase (APX)	23
3.7.2. Guaiacol peroxidase (POX)	23
3.8. Quantificação da lenhina	23
3.9. Quantificação de fenólicos Solúveis Totais	24
3.10. Quantificação de flavonóides totais	24
3.11. Análise Estatística	24

4. Resultados e Discussão	25
4.1. <i>Ensaio I – Influência da densidade do inóculo na severidade da doença</i>	<i>25</i>
4.1.1. <i>Determinação de unidades formadoras de colónias (UFC).....</i>	<i>25</i>
4.1.2. <i>Análise da expressão de genes APX, CAT, SOD, LOX1, SAM e TLP1</i>	<i>27</i>
4.2. <i>Ensaio II – Avaliação dos mecanismos de defesa contra a PSA</i>	<i>34</i>
5. Conclusão	42
6. Perspetivas Futuras	43
Bibliografia	44

Índice de Figuras

Figura 1 - Evolução da produção e da área cultivada de kiwi em Portugal entre 1994 e 2014.....	4
Figura 2 – Países onde o cancro bacteriano do kiwi, causado pela PSA, foi reportado.....	5
Figura 3 – Dispersão da PSA na região de Entre Douro e Minho – 2010 a 2016 (DRAPN, 2017)	6
Figura 4 - Sintomas da PSA (a): Exsudado no tronco; (b): Folha com necroses castanhas circundadas por halo amarelo; (c): Botões florais com necroses castanhas; (d): Folha com necroses castanhas de maiores dimensões; (e): Murchidão e morte de ramos.....	11
Figura 5 – Manutenção das plantas de kiwi micropropagadas por cultura in vitro em câmara de fotoclima.....	19
Figura 6- Número de Unidades Formadoras de Colónias (UFC) em plantas ‘Hayward’ e Ken’s Red artificialmente inoculadas com uma baixa densidade de inóculo (A) e com uma elevada densidade de inóculo (B) de PSA ou PFM, 1 e 2 dias pós inoculação (dpi).....	25
Figura 7 – Análise de expressão do gene APX em plantas ‘Hayward’ (A) e Ken’s Red’ (B) 1 e 2 dias pós inoculação artificial com uma de duas densidades distintas de PSA ou PFM.....	28
Figura 8 – Análise de expressão do gene CAT em plantas ‘Hayward’ (A) e Ken’s Red’ (B) 1 e 2 dias pós inoculação artificial com uma de duas densidades distintas de PSA ou PFM.....	29
Figura 9 – Análise de expressão do gene SOD em plantas ‘Hayward’ (A) e Ken’s Red’ (B) 1 e 2 dias pós inoculação artificial com uma de duas densidades distintas de PSA ou PFM.	30
Figura 10 – Análise de expressão do gene LOX1 em plantas ‘Hayward’ (A) e Ken’s Red’ (B) 1 e 2 dias pós inoculação artificial com uma de duas densidades distintas de PSA ou PFM.	31
Figura 11 – Análise de expressão do gene SAM em plantas ‘Hayward’ (A) e Ken’s Red’ (B) 1 e 2 dias pós inoculação artificial com uma de duas densidades distintas de PSA ou PFM.....	32
Figura 12 – Análise de expressão do gene TLP1 em plantas ‘Hayward’ (A) e Ken’s Red’ (B) 1 e 2 dias pós inoculação artificial com uma de duas densidades distintas de PSA ou PFM.....	33

Figura 13 – Concentração de clorofilas totais em plantas ‘Hayward’ e ‘Ken’s Red’, 1 e 2 dias pós inoculação (dpi) com solução de Ringer (controle), PSA ou PFM.....	35
Figura 14 – Concentração da enzima ascorbato peroxidase em plantas ‘Hayward’ e ‘Ken’s Red’ , 1 e 2 dias pós inoculação (dpi) com solução de Ringer (controle), PSA ou PFM.....	36
Figura 15 – Concentração da enzima guaiacol peroxidase em plantas ‘Hayward’ e ‘Ken’s Red’ 1 e 2 dias pós inoculação (dpi) com solução de Ringer (controle), PSA ou PFM....	37
Figura 16 – Concentração de lenhina em plantas ‘Hayward’ e ‘Ken’s Red’ 1 e 2 dias pós inoculação (dpi) com solução de Ringer (controle), PSA ou PFM.....	39
Figura 17 – Concentração de fenólicos solúveis totais em plantas ‘Hayward’ e ‘Ken’s Red’ 1 e 2 dias pós inoculação (dpi) com solução de Ringer (controle), PSA ou PFM....	40
Figura 18 – Concentração de flavonóides em plantas ‘Hayward’ e ‘Ken’s Red’ 1 e 2 dias pós inoculação (dpi) com solução de Ringer (controle), PSA ou PFM.....	41

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 – Classificação das populações de PSA, distribuição geográfica e virulência...</i>	8
<i>Tabela 2 – Primers utilizados para a análise de expressão genética por qRT-PCR.....</i>	22

1. Introdução

A cultura do kiwi em Portugal é uma das que mais tem vindo a crescer e a expandir-se, constituindo uma importante fonte de rendimento e desenvolvimento regional. O facto da época de produção ser diferenciada da do hemisfério Sul e da produção nacional ser de boa qualidade permite a comercialização desta produção para além do mercado interno, representando uma mais-valia para o país.

O cancro bacteriano do kiwi, provocado pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA), afeta as diferentes espécies de *Actinidia*, incluindo *A. deliciosa* (kiwi verde), *A. chinensis* (kiwi amarelo) e *A. arguta* (kiwi bebé), sendo atualmente a doença mais destrutiva desta cultura e responsável por acentuadas perdas económicas neste setor.

Desde a ocorrência de um surto devastador de PSA no Japão na década de 1980, a doença espalhou-se por quase todos os países produtores de kiwi, incluindo a Itália, Coreia do Sul, Portugal, Espanha e Nova Zelândia. Em Portugal, a PSA foi confirmada recentemente tendo sido identificada pela primeira vez em 2010, provocando perdas de produção até aos 85% (Renzi *et al.*, 2012). Após a infeção bacteriana através dos estomas, lenticelas e feridas, surgem os sintomas da doença, que variam desde manchas foliares, murchidão das plantas, necrose da flor e libertação de exsudados bacterianos ferruginosos.

O surto global de PSA tornou essencial a investigação e desenvolvimento de estratégias eficazes na contenção da pandemia e da minimização das perdas económicas para a indústria do kiwi. Apesar da implementação de novos métodos de controlo químico e biológico e do aparecimento de novas tecnologias de gestão de pomares e de programas de melhoramento para o controlo desta doença, esta está ainda longe de ser erradicada (Scortichini *et al.*, 2012). Para além disso, as metodologias de controlo da doença atualmente empregues podem ser extremamente dispendiosas e/ou apresentam problemas de fitotoxicidade, persistência ambiental, resistência bacteriana e acumulação de resíduos tóxicos nos frutos (Cameron *et al.*, 2014). Adicionalmente, os fatores relacionados com a interação patógeno-hospedeiro responsáveis pela maior/menor incidência da doença estão ainda pouco explorados. Neste sentido, este estudo tem como objetivo explorar quais os mecanismos fisiológicos e moleculares relacionados com a maior tolerância ao cancro bacteriano do kiwi, o que poderá ser determinante em programas de melhoramento seletivo como o desenvolvimento de novas cultivares e/ou porta-enxertos resistentes ao cancro bacteriano do kiwi.

1.1. A produção do kiwi a nível mundial e nacional

O kiwi é o fruto de algumas espécies do género *Actinidia*, as quais são originárias das regiões montanhosas chinesas, onde desde a antiguidade as plantas crescem como lianas, atingindo grandes alturas. Os relatos mais antigos conhecidos referentes à actinídea no resto do mundo remontam ao século XVIII e foram feitos por botânicos europeus que viajaram pela China e trouxeram as primeiras amostras da planta para a Europa. Na época, o fruto não tinha interesse comercial mas possuía valor para os colecionadores e como decoração. Foi na Nova Zelândia que a planta adquiriu significado comercial, sendo as primeiras produções obtidas em 1910. Atualmente, a actinídea cultiva-se tanto no Hemisfério Norte, de Outubro a Novembro, como no Hemisfério Sul, de Abril a Junho (Antunes, 2008).

O género *Actinidia* pertence à família Actinidiaceae, à ordem Ericales, à classe Magnoliopsida e à divisão Magnoliophyta. Dentro deste género já foram descritas mais de 60 espécies. As espécies de *Actinidia* de maior importância são a *Actinidia deliciosa* (kiwi verde) e a *Actinidia chinensis* (kiwi amarelo), sendo que a *Actinidia arguta* (kiwi bebé) que tem vindo a ser cada vez mais explorada. De facto, a produção mundial de *A. arguta* corresponde já a 17% do total de kiwi produzido mundialmente, sendo que *A. deliciosa* e *A. chinensis* são as espécies mais produzidas, com 37% e 31%, respetivamente, e *A. kolomitka* e outros híbridos interespecíficos as espécies com menor produção mundial, com 8% e 7%, respetivamente (Fideghelli, 2012).

Das principais cultivares femininas de *A. deliciosa*, a ‘Hayward’ é a mais cultivada em todo o mundo. Esta é uma planta geralmente vigorosa e muito produtiva, com frutos em forma elipsoidal e de grande tamanho e pesos médios ao redor de 105g e elevada densidade (Garcia *et al.*, 2014).

As principais cultivares femininas de *A. chinensis* são: ‘Hort16A’, ‘Sungold’ e ‘Jintao’. A ‘Hort16A’ foi uma cultivar obtida na Nova Zelândia em 1992, e hoje em dia é a cultivar desta espécie mais cultivada no mundo. É uma planta muito produtiva, com frutos de tamanho médio e o aroma floral muito pronunciado. A polpa é amarela e rica em açúcar, vitamina C, E e ferro (Garcia *et al.*, 2014).

Na *A. arguta* as principais cultivares femininas são: ‘Ananasnaja’, ‘Jumbo’ e ‘Ken’s Red’. Os frutos da *A. arguta* são bagas ovaladas de pequeno tamanho, que não superam os 20g. A sua pele é fina, sem pêlo e comestível, de cor verde ou avermelhada, dependendo da variedade. A polpa é verde de sabor similar ao kiwi verde ainda que muito mais doce, rica em antioxidantes, vitaminas e minerais (Garcia *et al.*, 2014).

A produção de kiwi representa uma importante atividade económica em vários países, tendo vindo a aumentar de uma forma geral nos últimos anos, tanto ao nível da produção como em área plantada. Os dados mais atuais da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2014) mostram que a superfície mundial ocupada com kiwi em 1994 era de 60 494ha, passando a 219 134ha em 2014 e que a produção mundial também cresceu de 928 010ton em 1994 para 3 447 604ton em 2014. No que respeita à distribuição geográfica, o maior produtor de kiwi é a Ásia, com cerca de 47% da produção mundial, seguindo-se a Europa, com 28%, a Oceânia, com 15%, e a América, com 10%. A China é o maior produtor mundial de kiwi, tendo apresentado uma produção de 1 765 847ton deste fruto em 2016, compreendendo mais de metade do volume total mundial, seguindo-se a Itália com 447 560ton e a Nova Zelândia com 382 337ton. A restante produção é assegurada por países como o Chile, Grécia, França, Turquia, Irão, Japão, EUA e Portugal, os quais completam o topo do ranking de maiores produtores mundiais (Worldatlas, 2016). Os países da Oceânia, principalmente a Nova Zelândia, apresentaram o maior valor exportado em 2016, compreendendo 47,4% das exportações globais, com exportações avaliadas em 1,02 bilhões de euros. Em segundo lugar, encontram-se os exportadores europeus, com 40%, enquanto 7,1% das exportações de kiwi são originárias da América do Sul e Caraíbas. A Ásia, com 4,2%, América do Norte (0,9%) e África (0,3%) completam as restantes exportações (Worldstopexports, 2016).

Em Portugal, foi a partir da década de 1990 que a produção de kiwi começou a ter maior interesse (Figura 1), graças ao valor interessante que a fruta tinha no mercado, ao baixo custo de produção, e por se tratar de uma cultura que tinha poucos problemas fitossanitários (Félix e Cavaco, 2004). As principais regiões produtoras de kiwi são o Entre-Douro e Minho e a Beira Litoral (INE, 2016). Segundo dados disponibilizados pelo Instituto Nacional de Estatística (INE) em 2016, em Portugal foram produzidas 21 07ton de kiwi numa área total de 2 380ha, das quais 16 918ton foram produzidas apenas na zona Norte do país. Ao nível de exportações e importações de kiwi, em 2015 Portugal exportou um valor de 14 810ton deste fruto, equivalentes a 15 654 000€, e importou 10 851ton, equivalentes a 12 638 000€ (INE, 2016).

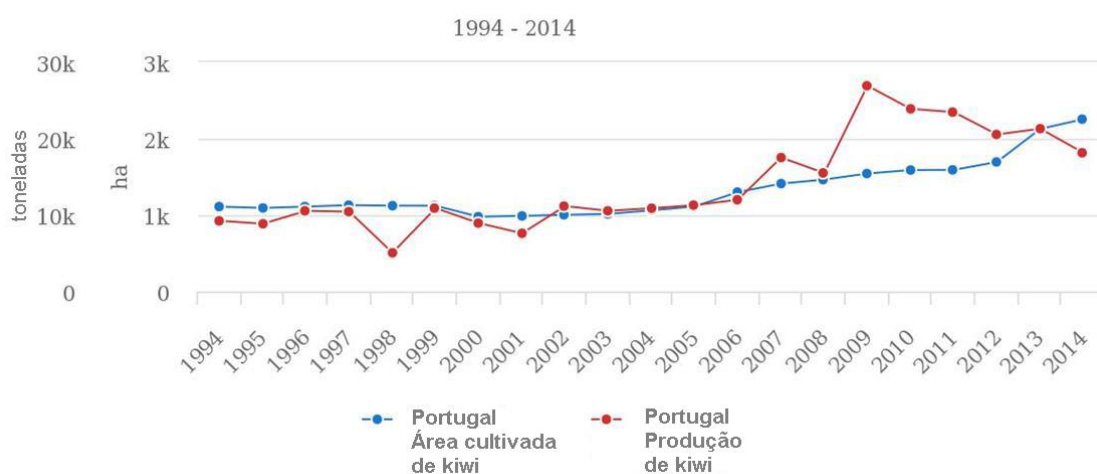


Figura 1 - Evolução da produção (ton) e da área cultivada (ha) de kiwi em Portugal entre 1994 e 2014 (FAOSTAT, 2017)

1.2. Enquadramento histórico e geográfico da doença

O cancro bacteriano do kiwi (CBK) foi identificado pela primeira vez em Shizuoka, Japão, no início da Primavera de 1984 onde sintomas generalizados apareceram em troncos e ramos de pomares maduros, com rebentos recém-emergentes durante a Primavera e o Verão a apresentar também sintomas da doença (Takikawa *et al.*, 1989).

Os surtos da doença multiplicaram-se rapidamente após fortes ventos e períodos húmidos, causando graves perdas de produtividade, morte de plantas afetadas e perda de pomares inteiros (Takikawa *et al.*, 1989). A mesma doença também foi descrita na província de Hunan, na China, durante 1984 e 1985, espalhando-se de seguida para outras regiões (Cameron *et al.*, 2014). As referências do aparecimento da doença

começaram então a espalhar-se pelos países produtores de kiwi, tal como está ilustrado na Figura 2.

Em Itália, o patogénio foi isolado há mais de 20 anos a partir de plantas sintomáticas de *A. deliciosa* na região de Latium, mas até ao ano de 2009 nunca causou danos substanciais na cultura. Durante a primavera-outono de 2008 observaram-se sintomas parecidos aos reportados anteriormente na China, sendo que nos anos subsequentes epidemias severas ocorreram um pouco por toda a Itália, tanto em *A. chinensis* como em *A. deliciosa*, tendo-se observado níveis de infeção entre os 50 e os 80 % de plantas infetadas (Balestra *et al.*, 2009).

Na Nova Zelândia, os sintomas da doença causada pela PSA foram notados inicialmente em *A. chinensis* cv. 'Hort16A' na região de Bay of Plenty durante outubro de 2010, tendo sido posteriormente observados também em *A. deliciosa* cv. 'Hayward'. Em menos de três anos após a sua descoberta a PSA foi identificada em mais de 1 400 pomares, representando 52% da superfície cultivada com kiwi neste país. Relatórios mais recentes reportam que 11 084ha foram confirmados como estando infetados com PSA, o que corresponde a 81% do total da superfície cultivada com kiwi (Donati *et al.*, 2014).

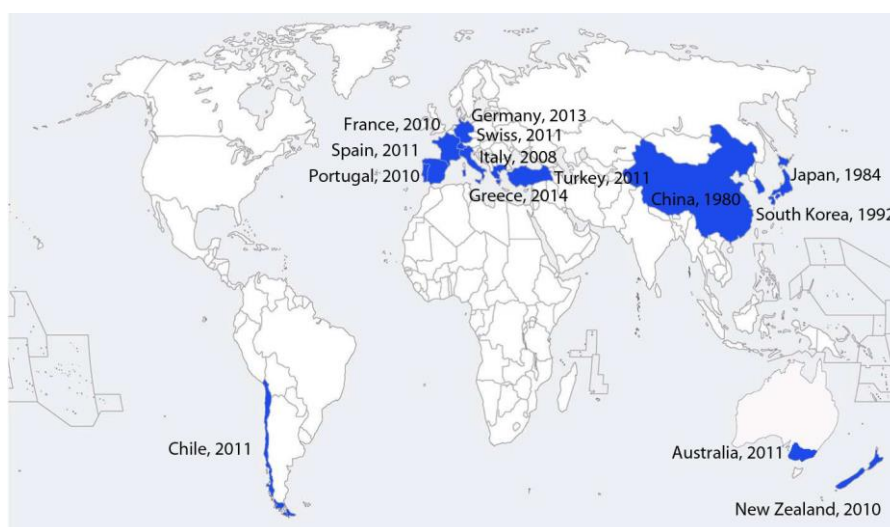


Figura 2 - Países onde o cancro bacteriano do kiwi, causado pela PSA, foi reportado (EPPO, 2017).

Estudos moleculares revelaram que a população de PSA que se encontra presentemente a causar danos graves nas plantas de kiwi difere da dos surtos anteriores na Itália e no Japão e não evoluiu da população bacteriana original (Ferrante *et al.*, 2012).

Em Portugal, o primeiro foco de PSA foi detetado em março de 2010, na região de Entre-o-Douro e Minho (Balestra *et al.*, 2010). Durante o ano de 2011, foram localizados vários novos focos em pomares localizados nos concelhos de Lousada e Amarante, igualmente situados no Norte de Portugal. No mesmo ano foram ainda detetadas na região Norte do país plantas infetadas provenientes de Itália. Já em 2012, a presença deste organismo nocivo foi oficialmente assinalada nos concelhos de Santa Maria da Feira, Valença, Vila do Conde, Marco de Canaveses e em Felgueiras, todos do Norte de Portugal (Figura 3). Foi também confirmado um foco no concelho de Oliveira do Bairro na região Centro. Os focos detetados foram todos notificados à Comissão Europeia (DGAV, 2012).

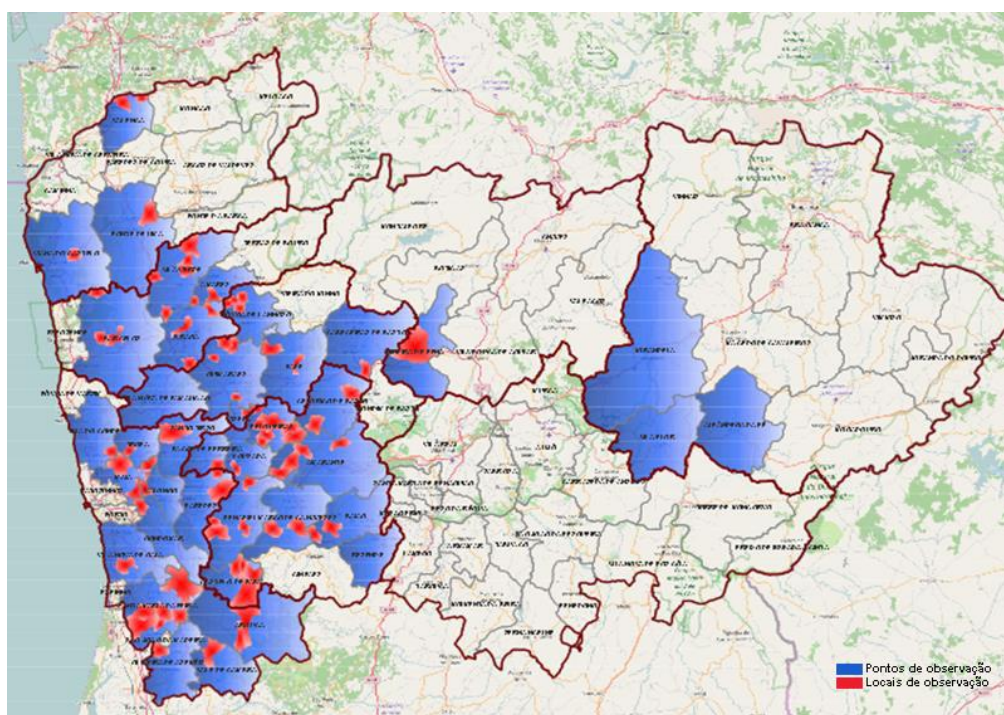


Figura 3 - Dispersão da PSA na região de Entre Douro e Minho – 2010 a 2016 (DRAPN, 2017).

1.3. Impacto económico da doença

Os surtos severos de PSA que têm vindo a ocorrer a uma escala mundial foram já responsáveis por perdas económicas importantes em França, Espanha, Portugal, Chile, Coreia do Sul e Japão, mas principalmente em países como Itália e Nova Zelândia onde a produção de kiwi é bastante importante para a economia nacional (Cameron *et al.*, 2014).

Um relatório recente da Unidade de Investigação de Agronegócios e Economia da Universidade de Lincoln (Lincoln, Reino Unido) previu graves efeitos económicos do surto de PSA na Nova Zelândia, com perdas estimadas de até 350 milhões de euros nos próximos cinco anos. A longo prazo, são estimadas perdas de até 756 milhões de euros em termos de desenvolvimento perdido (Cameron *et al.*, 2014).

Em Itália, entre 2010 e 2012, mais de 2 000ha de plantas de kiwi foram cortados ou destruídos devido à PSA. O impacto económico para os agricultores é estimado em 20 000€/ha/ano em perdas de produção, 50 000€/ha para o investimento no pomar e 15 000€/ha para destruição do material infetado, reduzindo a produção dos pomares em 10-50%. Em França, a PSA foi encontrada em cerca de 10% dos 4 700ha de kiwi e, em algumas regiões, 50% das plantas foram confirmadas como infetadas (Donati *et al.*, 2014). Em Portugal, a incidência da doença variou de 30% a 85% nas plantas infetadas (Renzi *et al.* 2012).

1.4. Taxonomia e diferentes populações da PSA

A *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pertence ao super-reino *Bactéria*, filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Pseudomonadales*, família *Pseudomonadaceae*, género *Pseudomonas*, espécie *Pseudomonas syringae* e patovar *actinidiae* (EPPO, 2012). Atualmente são conhecidas quatro populações de PSA (PSA1, PSA2, PSA3 e PSA4 - recentemente reclassificada como uma nova espécie, a *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* - PFM) (Tabela 1). As diferentes populações de PSA apresentam características fenotípicas, genéticas e de patogenicidade distintas, caracterizadas por diferenças na sequência de ácido desoxirribonucleico de diversos genes, bem como pela presença ou ausência de genes codificadores de faseolotoxina, coronatina e proteínas efetoras (Chapman *et al.*, 2012). Estas populações estão presentes em diferentes países produtores de kiwi e têm agressividades distintas, causando prejuízos também distintos, pelo que é importante conhecer a prevalência das populações de PSA numa região ou país. As estirpes de PSA pertencentes à população Psa1 estão presentes no Japão e em Itália tendo sido responsáveis pelo surto de PSA em 1992, e a sua virulência parece variar com a região geográfica em que se encontra. Embora geneticamente as estirpes isoladas nos dois países sejam muito semelhantes, no Japão causou importantes perdas económicas, o que não aconteceu em Itália, onde não provocou grande impacto na produção de kiwi. Esta situação sugere que as

condições climáticas ou as técnicas de produção utilizadas nos dois países podem ter influência na agressividade com que a bactéria infeta a planta (Scortichini *et al.*, 2012). As estirpes de PSA pertencentes à população PSA1 são caracterizadas por produzirem faseolotoxina e não produzem coronatina (Chapman *et al.*, 2012).

As estirpes da população PSA2 encontram-se apenas na Coreia do Sul e caracterizam-se por não produzirem faseolotoxina e possuírem um gene presumivelmente transmitido por plasmídeos que permite a produção de coronatina (Chapman *et al.*, 2012). A população PSA3, a mais virulenta e responsável por perdas económicas importantes, está oficialmente presente no Chile, China, Espanha, França, Itália, Portugal e Nova Zelândia. Apesar da sua alargada distribuição mundial e da sua severidade, as bactérias desta população não produzem faseolotoxina nem coronatina (Chapman *et al.*, 2012).

Tabela 1 – Classificação das populações de PSA, distribuição geográfica e virulência

População	Localização	Virulência
PSA1	Japão, Itália	Moderada
PSA2	Coreia	Moderada
PSA3	Chile, China, Espanha, França, Itália, Portugal, Nova Zelândia	Elevada
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidifoliorum</i> (PFM)	Austrália, Nova Zelândia, França	Reduzida

Estudos recentes sobre as características fenotípicas, moleculares e de patogenicidade de PSA permitiram reclassificar a população Psa4 como uma nova estirpe, designada *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. *nov.* (Cunty *et al.*, 2015), que é caracterizada por causar apenas sintomas nas folhas, não conduzindo à morte das plantas. Foi já isolada da Nova Zelândia, Austrália e França, embora se pense que esteja presente em todos os países produtores de kiwi da Europa (Moura *et al.*, 2015).

1.5. Ciclo da doença

A bactéria é capaz de penetrar os tecidos da planta através de aberturas naturais (estomas e lenticelas) ou de lesões artificiais provocadas pelo vento ou por ferramentas de poda, tendo capacidade de se movimentar através do sistema vascular da planta

(Ferrante *et al.*, 2012). O inóculo bacteriano pode ocorrer aparentemente em qualquer altura do ano. No entanto, as épocas mais favoráveis ao seu desenvolvimento são o fim do inverno, início da primavera e o outono, dado que as condições de temperatura e humidade são mais favoráveis à manutenção e reprodução da bactéria. Para além disso, o risco de infeção é superior no outono, uma vez que nesta altura são realizadas operações culturais mais intensivas que promovem a ocorrência de feridas artificiais. Adicionalmente, o risco de infeção é potenciado nesta altura do ano devido às feridas naturais resultantes da colheita dos frutos e da queda das folhas (Vanneste *et al.*, 2011; Ferrante *et al.*, 2012). No verão, quando as temperaturas sobem acima de 27°C, a dispersão da PSA e a infeção de plantas de kiwi são totalmente inibidas, sendo a sua virulência superior a temperaturas entre os 10°C e os 20°C (Scortichini *et al.*, 2012).

Pensa-se que no inverno a PSA se possa manter nos tecidos de plantas infetadas, como é característico das bactérias *P. syringae* que infetam plantas lenhosas, podendo mesmo migrar até às raízes da planta onde se mantém inativa (Vanneste *et al.*, 2011). No final do inverno pode iniciar-se a dispersão da bactéria através da produção de exsudados bacterianos a partir dos cancrios antigos (Ferrante *et al.*, 2012). Quando a temperatura começa a aumentar, com o início da primavera, a bactéria aumenta a sua multiplicação, sendo a época do ano preferencial para a disseminação dentro da planta e entre plantas no mesmo pomar. A migração dentro da planta hospedeira ocorre através dos vasos xilémicos e representa uma fase importante do ciclo da doença, uma vez que pode resultar na formação de cancrios que permitem a dispersão de inóculo bacteriano no ambiente através da produção de exsudados ferruginosos. Nesta fase podem aparecer necroses nos botões florais, posterior necrose das pétalas ou mesmo queda em massa das flores (Ferrante *et al.*, 2012).

No verão, a população de PSA pode diminuir devido ao aumento da temperatura, embora a bactéria tenha a capacidade de sobreviver a temperaturas elevadas, podendo observar-se apenas a diminuição da sua atividade. A população bacteriana e a sua atividade voltam posteriormente a aumentar quando as temperaturas decrescem com a chegada do outono (Vanneste *et al.*, 2011).

1.6. Sintomas

No início da primavera o sintoma mais proeminente é a produção de exsudado avermelhado associado a cancrios e feridas nos troncos e ramos infetados (Fig. 4A). No caso de não haver exsudado, pode ser observada uma coloração vermelha-

acastanhada por baixo da casca. Embora seja mais difícil de detetar, pode ainda ocorrer a formação de gotas de exsudado branco nos tecidos, o qual é consequência da bactéria estar a ser expelida dos tecidos infetados após um período de intensa multiplicação bacteriana. A produção deste exsudado não ocorre sempre associada aos outros sintomas, podendo ser observada antes da floração e no verão. Durante a primavera podem ainda surgir manchas e necroses nas folhas (Fig. 4B), e necroses castanhas nos botões florais (Fig. 4C), que podem levar ao abortamento floral, impedindo assim a formação de fruto (Vanneste *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2015). Outro sinal igualmente importante de que o pomar pode estar infetado com PSA é a morte repentina de plantas, com a parte aérea da planta a murchar em poucos dias (Andolfi *et al.*, 2014).

No verão, o sintoma mais notório é o aparecimento de pequenas manchas necróticas angulares nas folhas que podem começar a formar-se no final da primavera, podendo apresentar ou não, um halo amarelo (Fig. 4B). Estas manchas podem acabar por se juntar, formando necroses castanhas de maiores dimensões (Fig. 4D, Moura *et al.*, 2015). Os ramos podem começar a secar a partir do meio, o local por onde presumivelmente a bactéria entrou no tecido, secando posteriormente em ambas as direções, com a consequente perda dos frutos (Fig. 4E).

Na parte final do verão e durante o outono podem começar a formar-se cancrios nos troncos e nos ramos. No final do outono a bactéria pode entrar na planta através das diversas feridas resultantes da colheita do fruto e da queda das folhas, como descrito anteriormente. No entanto, os sintomas das novas infeções só aparecerão na primavera seguinte (Vanneste *et al.*, 2011).

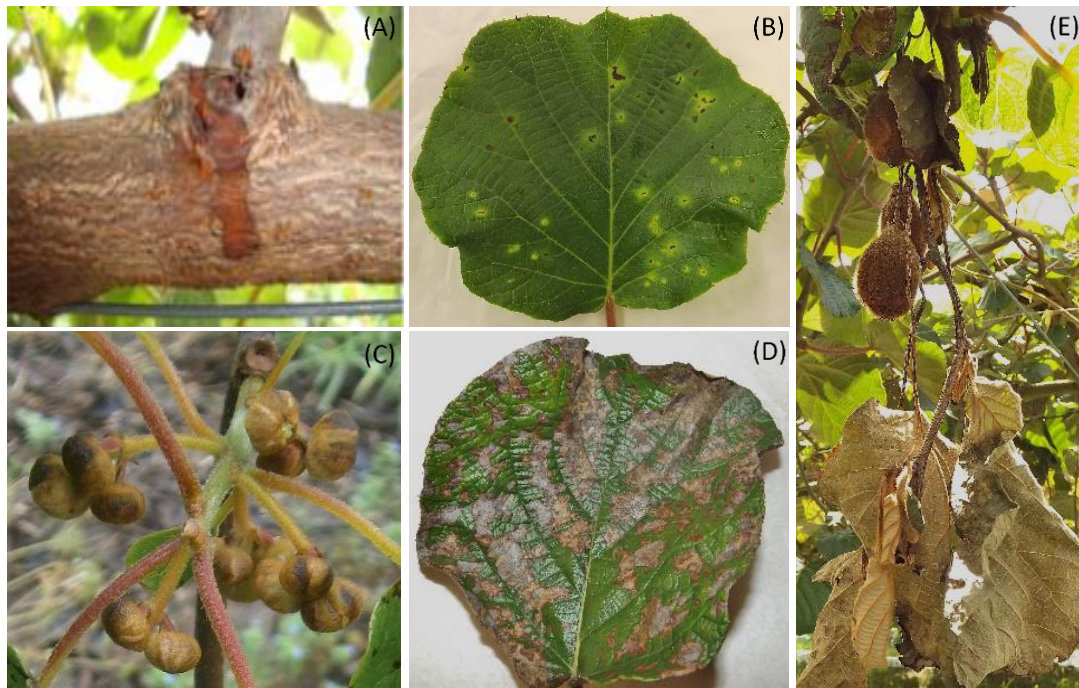


Figura 4 - Sintomas da PSA: (A) Exsudado no tronco; (B) Folha com necroses castanhas circundadas por halo amarelo; (C) Botões florais com necroses castanhas; (D) Folha com necroses castanhas de maiores dimensões; (E) Murchidão e morte de ramos. Adaptado de Moura *et al.* (2015).

Alguns sintomas desta doença não são específicos, o que dificulta a sua identificação no campo. Por exemplo, a morfologia das manchas nas folhas e as necroses nas flores causadas pela PSA são semelhantes às causadas por outras bactérias patogénicas das actínídeas. Entre os restantes sintomas, os que parecem ser mais específicos de PSA são a produção de exsudados brancos e avermelhados e a morte dos rebentos no verão (Vanneste *et al.*, 2011).

Apesar desta doença afetar todas as plantas do género *Actinidia*, existe uma variação considerável na suscetibilidade de diferentes cultivares ao cancro bacteriano do kiwi. A 'Hort16A' e outras cultivares de *A. chinensis* mostram consistentemente maior incidência e gravidade da doença do que as cultivares de *A. deliciosa* (Balestra *et al.*, 2009). A *A. arguta* parece ser menos suscetível à PSA, visto que dos surtos reconhecidos apenas alguns sintomas foram identificados e levaram a perdas de produção menores (Vanneste *et al.*, 2014).

1.7. *Controlo da doença*

Com o aumento dramático do número de pomares infetados, os países produtores de kiwi viram-se forçados ao estabelecimento de estratégias de controlo da doença coordenadas globalmente e regionalmente por forma a conter a pandemia e

minimizar as perdas económicas. O controlo do cancro bacteriano do kiwi depende fortemente de métodos preventivos, uma vez que não existe tratamento curativo para plantas infetadas com PSA. As defesas químicas podem ser aplicadas preventivamente para ajudar a conter a propagação da doença, mas como não são suficientes para a prevenção do aparecimento da doença devem ser acompanhadas de medidas gerais para reduzir o inóculo através de uma boa higiene do pomar e da gestão de campo apropriados (Donati *et al.*, 2014).

1.7.1. Meios culturais

A transmissão associada à ação do homem, como a utilização de máquinas agrícolas e equipamentos de poda em diferentes pomares sem se proceder à desinfecção dos mesmos, é o principal veículo de infeção entre pomares e dentro do mesmo pomar. No entanto, há uma grande variedade de outros fatores bióticos e abióticos que têm um papel de grande importância no processo de contaminação de pomares e dispersão da doença, tais como a atividade das abelhas, de outros insetos e de aves, a ocorrência de fortes e intensas precipitações e de ventos fortes e as lesões causadas nas plantas pela queda de granizo e pelas geadas.

No caso de sintomas nítidos, como a presença de os exsudados ferruginosos, as plantas infetadas que mostrarem sintomas no tronco devem ser monitorizadas e avaliadas (idade da planta, localização e extensão dos sintomas) a fim de se tomar a decisão que melhor minimize a dispersão da doença. Estas plantas devem ser arrancadas e destruídas sem necessidade de confirmação laboratorial, ou deve proceder-se ao arranque do tronco até 1m abaixo do ponto de infeção, desde que não sejam visíveis sintomas de infeção nos feixes. As plantas com sintomas apenas nos ramos e ou folhas devem ser podadas pelo menos 70cm abaixo do ponto de infeção, ou até não se observarem sintomas de infeção nos feixes. Todas as feridas resultantes das podas sanitárias devem ser desinfetadas e seladas com produtos apropriados, normalmente à base de cobre. Adicionalmente, todos os pomares em que forem detetadas plantas infetadas devem ser alvo de particular cuidado, nomeadamente no que respeita à desinfecção de todo o equipamento agrícola, tais como tesouras de poda e equipamento de proteção pessoal, e ao movimento de ramos e material resultante das podas, o qual deve ser destruído no próprio pomar. Todo o material agrícola que tenha vindo de outro pomar deve ser desinfetado, incluindo as alfaia agrícola, rodas dos tratores, e os utensílios usados na poda devem ser regularmente desinfetados ao longo

do dia (álcool a 70%, durante 2min). Em redor de cada pomar onde tenha sido detetado um foco de infeção deverá ser estabelecida uma zona de segurança de 500m na qual será efetuada uma prospeção mais intensiva (DGAV, 2012).

Apesar da implementação destas medidas fitossanitárias, o patogénio ainda é passível de se disseminar, uma vez que a remoção de todo o inóculo não é garantida, dado que apenas plantas que foram infetadas e que tiveram tempo para expressar os sintomas são removidas. De facto, as plantas ou parte de plantas que tenham sido infetadas e que ainda não tenham sintomas visíveis, ou as plantas nas quais a PSA esteja presente como epifítica não são removidas, o que permite que a doença continue a espalhar-se no pomar (Vanneste *et al.*, 2011).

1.7.2. Meios biológicos

Estudos realizados na Nova Zelândia por Frampton *et al.* (2014) permitiram a identificação de bacteriófagos em pomares de kiwi, os quais foram testados contra uma coleção de diferentes estirpes de PSA e de outras bactérias presentes habitualmente nos pomares deste fruto. Estes testes antibacterianos demonstraram que os bacteriófagos isolados têm a capacidade de infetar as duas estirpes bacterianas infecciosas do kiwi presentes na Nova Zelândia: a Psa3 e a PFM (Frampton *et al.*, 2014). Os autores verificaram que a variedade de hospedeiros bacterianos que cada fago consegue infetar em particular foi reduzida, sugerindo que o desenvolvimento de uma mistura de fagos com atividade contra a PSA terá um impacto mínimo na restante microflora do pomar. Os resultados obtidos mostraram ainda que estes têm a capacidade de infetar a maioria das estirpes de PSA isoladas na Nova Zelândia e na Europa, mas não as provenientes do Japão ou Coreia, o que demonstra que o desenvolvimento de um tratamento à base de fagos pode ser aplicável com sucesso em algumas áreas geográficas, embora as condições climáticas possam provocar alterações que têm que ser tidas em conta.

1.7.3. Meios químicos

Os tratamentos químicos para combater a PSA são meramente preventivos e têm maior eficácia quando aplicados num estágio inicial do desenvolvimento da doença. O controlo químico atualmente empregue nos pomares de kiwi é altamente dependente

da pulverização de compostos bactericidas tais como as formulações de estreptomicina e cobre (Vanneste *et al.*, 2011). Os tratamentos com produtos à base de cobre são recomendados na primavera, antes da rebentação, no outono, após a queda das folhas, e sempre que as plantas apresentem feridas devido ao granizo ou ventos fortes. As adubações deverão ter por base análises de solo e foliares, evitando o vigor excessivo das plantas. Deve-se ainda manter o controlo do coberto vegetal no pomar (DRAPN, 2011). Embora o cobre seja um micronutriente essencial para os organismos, quando utilizado em excesso é tóxico, sendo amplamente usado na agricultura como meio de luta contra diferentes agentes patogénicos das plantas. No entanto, estes compostos usados como bacteriostáticos já mostraram ser fitotóxicos, provocando danos tanto em folhas como em caules. Adicionalmente são já conhecidos casos de resistência de PSA a estes compostos de cobre (Vanneste *et al.*, 2011; Cameron *et al.*, 2014).

Embora pareça que a actínídea seja relativamente tolerante a novas formulações de cobre, o seu uso excessivo poderá conduzir a fenómenos de fitotoxicidade, acumulação no solo e seleção de estirpes da bactéria resistentes ou tolerantes ao cobre, o que diminuirá a sua eficácia (Vanneste *et al.*, 2011).

A estreptomicina é um antibiótico amplamente utilizado no controlo de doenças de plantas, tais como o tomate, e é considerado o tratamento químico atualmente mais efetivo no controlo da PSA. A sua capacidade antimicrobiana deve-se ao facto de se ligar de forma irreversível à subunidade 16S do ácido ribonucleico (ARN) ribossomal do ribossoma 30S da bactéria, interferindo na tradução de ARN mensageiro (mARN) das proteínas e, conseqüentemente, conduzindo à morte celular. No entanto, para além de não ser permitido o uso de antibióticos na agricultura na Europa, foram já reportados casos de resistência de PSA à estreptomicina em pomares frequentemente pulverizados com este antibiótico (Nakajima *et al.*, 1995; Cameron *et al.*, 2014). Apesar do seu relativo sucesso no controlo da dispersão da PSA, ambos os produtos químicos apresentam problemas de fitotoxicidade, resistência bacteriana e acumulação residual nos frutos (Cameron e Sarojini, 2014).

Por forma a superar as limitações dos produtos à base de cobre e antibióticos, vários autores testaram a eficácia de outros compostos contra a PSA, tais como óleos essenciais de plantas, quitosano e péptidos antimicrobianos. Os óleos essenciais das plantas *Pimenta racemosa*, *P. dioica*, *Melaleuca linariifolia*, *M. cajuputi*, e *Cinnamomum cassia* demonstraram boa capacidade inibitória contra a PSA, sendo que, dos seus constituintes principais o eugenol, o estragol, o metileugenol e o cinamaldeído promoveram a maior atividade inibitória (Dine *et al.*, 2016). No entanto, a sua eficácia *in planta* tem ainda de ser comprovada (Cameron e Sarojini, 2014). O quitosano é obtido a partir do exosqueleto de crustáceos e é conhecido pela sua atividade antimicrobiana

contra diversos patógenos de plantas, tendo já mostrado boa atividade contra a PSA em ensaios de campo, reduzindo o número de exudados bacterianos (Scortichini *et al.*, 2014). Não obstante, o seu mecanismo de ação e efeitos a longo prazo necessitam de ser elucidados. Também a eficácia de péptidos antimicrobianos foi já demonstrada *in vitro* (Cameron *et al.*, 2003), no entanto o seu potencial necessita de ser explorado.

1.8. Resposta fisiológica, bioquímica e molecular à infeção

As interações entre a planta hospedeira e a bactéria que a coloniza são altamente complexas, uma vez que após a infeção ocorrem múltiplos fatores bacterianos e eventos de sinalização na planta, o que, em última análise, define a suscetibilidade ou a resistência da planta exposta ao patógeno. Neste contexto, a avaliação das alterações proteicas que ocorrem em ambos os organismos durante a infeção sistémica é considerada importante para desvendar as vias essenciais e os principais efetores que ajudam na colonização de patógenos e/ou o seu combate (Petriccione *et al.*, 2012).

Considera-se que a PSA tem uma fase biotrófica assintomática precoce, isto é, colonização da folha sem causar sintomas aparentes, seguida de uma fase necrotrófica subsequente. Esta ocorre quando a bactéria consegue superar com sucesso os mecanismos de defesa da planta, que se caracteriza pela degradação do tecido e o aparecimento dos sintomas da doença (Petriccione *et al.*, 2014).

As famílias de proteínas detetadas durante a colonização da PSA incluem membros de diferentes categorias de defesa, tais como proteínas resistentes ao stress oxidativo e calor, polipéptidos relacionados com a patogenia e proteínas envolvidas na proteção básica da planta, sugerindo o envolvimento de vias diferentes, mas co-reguladas, na resposta da planta do kiwi à doença. Algumas destas proteínas estão consistentemente envolvidas no impedimento do estabelecimento de sintomas, sendo eficazes na prevenção da fase necrotrófica do ciclo patogénico da bactéria (Petriccione, *et al.*, 2014). Em plantas *A. deliciosa* infetadas artificialmente, a peroxidase 4 e as proteínas de choque térmico, por exemplo, foram as mais produzidas nos primeiros dias da colonização da PSA, enquanto que as quitinases e as proteínas relacionadas com a patogénese foram induzidas a partir de então e contribuíram para conter o número de células bacterianas, evitando assim uma maior incidência da doença (Petriccione, *et al.*, 2014). Para além da intervenção de uma vasta gama de famílias proteicas, também as

enzimas antioxidantes parecem desempenhar um papel importante na resposta das plantas *Actinidia* contra a PSA (Petriccione *et al.*, 2014).

Uma das primeiras respostas de uma planta à invasão por agentes patogénicos é conhecida como explosão oxidativa. As concentrações elevadas de espécies reativas de oxigénio (EROs) são produzidas na membrana plasmática das células mais próximas do patogénio. Embora as EROs sejam produzidas como parte do metabolismo normal durante a fotossíntese e a respiração, as concentrações envolvidas durante o combate a agentes invasores são de magnitude suficiente para sobrecarregar até mesmo as próprias defesas antioxidantes da planta. Durante os processos de defesa das plantas, as EROs atuam não só como toxinas, capazes de matar diretamente ou diminuir o crescimento do patogénio, mas também como parte de uma cascata de sinalização que pode levar à indução de múltiplas vias de defesa, incluindo a resposta hipersensível, modificações na parede celular e mudanças na expressão de genes (Fones *et al.*, 2012).

Quando em altas concentrações, todas as EROs são extremamente prejudiciais aos organismos e quando o nível de EROs excede os mecanismos de defesa, diz-se que uma célula está em estado de *stress* oxidativo. O aumento da concentração de EROs durante situações de *stress* pode representar uma ameaça para as células, causando peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas, danos para ácidos nucleicos, inibição enzimática e, finalmente, levar à morte das células. Apesar da sua atividade destrutiva, as EROs são descritas numa variedade de processos celulares, incluindo a tolerância a *stresses* ambientais. O equilíbrio entre a produção e eliminação de EROs é que determina se as mesmas atuam como uma molécula prejudicial ou de sinalização. Devido aos papéis multifuncionais das EROs, é necessário que as células controlem o nível de EROS para evitar qualquer lesão oxidativa e para as não eliminar completamente. Para evitar o dano oxidativo é necessária a eliminação de EROs em excesso, o que requer a ação de vários componentes antioxidantes como as enzimas antioxidantes e compostos fenólicos. Estes últimos são constituídos por diversos metabolitos secundários (flavonóides, taninos, ésteres e lenhina), dos quais os flavonóides são uma das maiores classes de fenólicos (Sharma *et al.*, 2012). As antocianinas são pigmentos flavonóides coloridos solúveis em água produzidos por plantas para proteger a folhagem dos efeitos nocivos da radiação ultravioleta. Estas são responsáveis pelas cores vistosas de muitas plantas e estão presentes em altas concentrações em flores, frutas e folhas de plantas no outono. As fitoalexinas são isoflavonóides com propriedades antibióticas e antifúngicas produzidas em resposta ao ataque de patogénios. Os taninos são polímeros de flavonóides solúveis em água produzidos por plantas e armazenados em vacúolos. Os taninos são tóxicos para insetos porque se ligam a proteínas salivares e enzimas digestivas, incluindo tripsina e

quimotripsina, resultando na inativação de proteínas. A lenhina é um polímero heterogêneo altamente ramificado encontrado principalmente nas paredes celulares secundárias das plantas, embora as paredes primárias também possam se tornar lenhificadas, que consiste em centenas ou milhares de monómeros fenólicos e é um componente primário da madeira. Por ser insolúvel, rígida e virtualmente indigestível, a lenhina fornece uma excelente barreira física contra o ataque de patógenos (Freeman *et al.*, 2008).

As enzimas antioxidantes diretamente envolvidas na desintoxicação de EROs nas plantas são a ascorbato peroxidase (apx), a catalase (cat) e o superóxido dismutase (sod), as quais protegem as células vegetais do dano oxidativo induzido como resposta à invasão de patógenos. A superóxido dismutase catalisa a dismutação de O_2^- para H_2O_2 , a catalase dissolve o H_2O_2 em oxigênio e água, e a ascorbato peroxidase reduz H_2O_2 em água, utilizando ascorbato como doador de elétrons específico (Sharma *et al.*, 2012).

Petriccione *et al.* (2015) procederam à inoculação artificial de folhas de *A. deliciosa* com duas doses de PSA durante um período de 13 dias, seguida da análise de expressão de três genes alvo, codificando as enzimas antioxidantes: ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os autores verificaram que nas folhas de *A. deliciosa* inoculadas com uma dose elevada de inóculo bacteriano ocorreu uma regulação positiva na expressão de ácido ribonucleico mensageiro (mARN) de APX durante o curso do tempo, enquanto que a transcrição dos genes CAT e SOD diminuiu durante os primeiros 4 dias, aumentando posteriormente, independentemente da densidade do inóculo bacteriano.

2. *Objetivos do trabalho*

Ainda pouco se sabe sobre a interação entre as plantas de Actinidia e a PSA e a PFM, nomeadamente no que concerne aos mecanismos de reconhecimento do patógeno em cultivares menos suscetíveis e quais as características fenotípicas e genotípicas responsáveis por essa maior resistência. Neste contexto o objetivo deste trabalho é contribuir para a elucidação acerca dos mecanismos fisiológicos e moleculares relacionados com a maior ou menor tolerância/suscetibilidade à PSA nas cultivares mais importantes de kiwi. Especificamente, os objetivos deste trabalho foram: a) perceber o grau de suscetibilidade de uma cultivar de *A. deliciosa* e outra de *A. arguta* a duas estirpes bacterianas com virulência distinta; b) compreender a resposta de defesa das plantas quando infetadas artificialmente com duas densidades bacterianas diferentes; c) identificar genes envolvidos no mecanismo de defesa das plantas diferencialmente expressos em plantas artificialmente infetadas com duas densidades bacterianas diferentes e d) explorar mecanismos de defesa metabólicos envolvidos na defesa de duas espécies de Actinidia com tolerância contrastante à doença após inoculação com uma densidade elevada de PSA.

3. Material e métodos

3.1. Material vegetal e delineamento experimental

Neste estudo foram levados a cabo dois ensaios, tendo sido em ambos os casos usadas plantas *in vitro* das cultivares *A. deliciosa* cv. 'Hayward' e a *A. arguta* cv. 'Ken's Red', mantidas em meio de cultura MS (Murashige and Skoog, 1962), suplementado com 20g/L sucrose e 0.5mg/L da citocinina reguladora de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP). As plantas foram mantidas numa sala de fitoclima a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com 85% de humidade relativa e fotoperíodos de 16h de luz e 8h de escuro (Figura 5).



Figura 5 - Manutenção das plantas de kiwi micropropagadas por cultura *in vitro* em câmara de fitoclima.

3.1.1. Ensaio I – Influência da densidade do inóculo na severidade da doença

No ensaio 1 foi analisada a sensibilidade de duas espécies de plantas de kiwi à PSA e PFM. As plantas, mantidas em condições *in vitro*, foram inoculadas com um de dois inóculos bacterianos: um com baixa densidade de inóculo ("Baixa DI" - 1.5×10^8 bactérias/mL) e outro com elevada alta densidade de inóculo ("Alta DI" - 3×10^8 bactérias/mL), ou com solução de Ringer (controlo). Um dia pós inoculação (dpi) e dois dpi foram feitas amostragens destrutivas para determinação de unidades formadoras de colónias (UFC) através da colonização bacteriana registada nos tecidos das plantas infetadas, e a restante planta foi conservada em azoto líquido e armazenada a -80°C para posterior análise genómica dos genes *APX*, *CAT*, *LOX1*, *SAM*, *SOD* e *TLP1* por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR).

Cada tratamento experimental possuiu três réplicas biológicas sendo que cada réplica biológica resultou da junção (*pool*) de três plantas independentes.

3.1.2. Ensaio II – Avaliação dos mecanismos de defesa contra a PSA

No ensaio 2, que visou a avaliação de metabolitos envolvidos na defesa da planta após inoculação com uma elevada densidade bacteriana, plantas *in vitro* foram infetadas artificialmente com uma densidade elevada de inóculo de PSA ou PFM, enquanto que as plantas controlo foram tratadas com solução de Ringer. Foram realizadas amostragens destrutivas um e dois dpi e, após as quais se determinou vários compostos envolvidos na capacidade de defesa das plantas (compostos fenólicos solúveis totais, lenhina, compostos flavonóides e enzimas antioxidantes).

Cada tratamento experimental possuiu três réplicas biológicas sendo que cada réplica biológica resultou da junção (pool) de três plantas independentes.

3.2. Manutenção da cultura bacteriana e preparação do inóculo

Neste estudo foram utilizadas duas estirpes bacterianas: uma estirpe virulenta de *P. syringae* pv. *actinidiae* pertencente à população Psa-3 (CFBP 7286, proveniente de Itália) e uma estirpe menos virulenta de *P. syringae* pv. *actinidifoliorum* (PFM - ICMP 18804, proveniente da Nova Zelândia). As culturas bacterianas foram mantidas em meio de cultura Agar Nutriente Sucrose (ANS) e incubadas durante 48h a 27°C no escuro. As culturas foram repicadas sempre que necessário e foram mantidas ao longo do período experimental. Para a preparação do inóculo bacteriano, com o auxílio de uma ansa estéril passou-se uma colónia de PSA ou PFM para um tubo de centrifuga com solução de Ringer estéril até à densidade desejada.

3.3. Inoculação das plantas e determinação de unidades formadoras de colónias (UFC)

A inoculação das plantas foi feita através do esfregaço da página inferior de cada folha de cada planta usando uma zaragatoa estéril embebida em solução bacteriana. As plantas controlo foram sujeitas ao mesmo tratamento com solução de Ringer.

Para avaliar o grau de colonização bacteriana nos tecidos das plantas infetadas, a ponta (ca. 0,5cm comprimento) das primeiras três folhas totalmente expandidas foram recolhidas com uma tesoura estéril. As amostras foram esterilizadas através da lavagem

em 70% etanol durante 1min, seguido de 1min em 1% hipoclorito de sódio e enxaguadas duas vezes em água esterilizada durante 2min. O tecido foi depois homogeneizado em 10mL de solução de Ringer e sucessivamente diluído 1:9 em solução de Ringer até à diluição de 10^{-9} . Cem microlitros de cada amostra foram posteriormente cultivados em meio ANS e incubados durante 3 dias a 27°C no escuro. Após este período de tempo contabilizou-se o número de colónias de cada amostra e o número de UFC foi determinado como:

$$\text{Número bactérias} = \text{n}^{\circ} \text{ colónias} \times \text{volume plaqueado (mL)} \times \text{fator diluição}$$

3.4. Extração de ácido ribonucleico (ARN)

Para a extração de ARN, cerca de 100µg de tecido vegetal homogeneizado em azoto líquido foi misturado com 1mL de buffer de extração (100mM Tris-HCl, pH 8.0, 4% CTAB w/v, 4% PVP K40 w/v, 30mM EDTA, 2.0 M NaCl, 0.1% espermidina w/v, 2% β-mercaptoetanol v/v) previamente aquecido a 70°C. De seguida, adicionou-se 1mL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v) e centrifugou-se duas vezes por 15min a 15 000g e 4°C, transferindo-se o sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se 250µL de cloreto de lítio (12M) e deixou-se as amostras a incubar durante a noite a -20°C. Após centrifugação durante 35min a 15 000g e 4°C, lavou-se o *pellet* com etanol 70% frio e deixou-se as amostras a secar ao ar por 1h. Por fim, suspendeu-se o ARN em 40µL de água estéril para biologia molecular. A concentração e a pureza do ARN extraído foram avaliadas com base nas absorvâncias a $\lambda = 230, 260$ e 280nm num nanofotómetro NanoPhotometer (Implen GmbH, Munique, Alemanha) considerando-se adequadas as quantidades de ARN acima de 100ng/µL.

3.5. Síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cADN) e análise de genes por qRT-PCR

Para converter o ARN em ácido desoxirribonucleico complementar (cADN), a transcrição foi realizada através do kit de síntese de cADN iScript™ cDNASynthesis Kit (BIORAD, Califórnia, EUA) no qual, para uma reação com volume total de 20µL, se adicionou 4µL de iScript ReactionMix a 4µL da enzima Transcriptase Reversa, 2µL de ARN a 100ng/mL e 10µL de água para biologia molecular. A síntese de cADN foi

concluída após incubação das amostras a 25°C durante 5min, 42°C por 30min e 85°C durante 5min num termociclador (*VWR DOPPIO*, Radnor, Pensilvânia), após a qual o cADN foi diluído 1:100 e armazenado a -20°C até posterior análise.

A expressão de genes foi determinada por qRT-PCR. Cada reação foi realizada num volume total de 20µL, contendo 10µL SYBR Green SuperMix (Bio-Rad, Califórnia, EUA), 1µL de cada um dos primers e 8µL de ADN. As condições de reação utilizadas foram: 30s a 98°C, seguido de 40 ciclos de amplificação (otimizados para cada gene, Tabela 2) sendo os perfis das curvas analisados para cada gene testado. Como controlo foram utilizados os genes actina (ACT) e proteína fosfatase 2A (PP2A).

Tabela 2 – Primers utilizados para a análise de expressão genética por qRT-PCR.

Gene	Primers			Referência
	Forward	Reverse	Temp. annealing (°C)	
ACT	CCAAGGCCAACAGAGAGAAG	GACGGAGGATAGCATGAGGA	56,0	Petriccione <i>et al.</i> , 2015
PP2A	GCAGCACATAATTCCACAGG	TTTCTGAGCCCATAACAGGAG	55,2	
APX	GGAGCCGATCAAGGAACAGT	AACGGAATATCAGGGCCTCC	61,8	
CAT	GCTTGGACCCAACATCTGCT	TTGACCTCCTCATCCCTGTG	56,9	
SOD	CACAAGAAGCACCACCAGAC	TCTGCAATTTGACGACGGTG	57,8	
LOX1	GTTAGAGGGGTGGTGACTCT	CTTAGCACTGCTTGTTGC	53,5	Este estudo
SAM	GAATAGTACTTGCCCTGGC	TACAAATCGACCAGAGGGGT	55,1	
TLP1	CAACCCCTAACACACTAGC	ATTTCCGGAGTTGCAACAGT	54,6	

3.6. Quantificação de Clorofilas

Para a quantificação de clorofilas, 0,5g de material fresco foi pesado e misturado com 10mL de metanol e deixado a extrair por 48h. Após este período as amostras foram analisadas nanofotómetro NanoPhotometer (Implen GmbH, Munique, Alemanha) a 663nm e 645nm e total de clorofilas foi calculado como:

$$\text{Total de Clorofilas} = 8,02 \cdot A_{663} + 20,21 \cdot A_{645}$$

3.7. Quantificação de enzimas antioxidantes

Para a quantificação de enzimas antioxidantes, 100mg de tecido vegetal foi extraído com 1,5mL de tampão de extração contendo 100 mM fosfato de potássio, 1mM EDTA, 1 mM PMSF e 2% PVP (w/v), sendo depois misturado vigorosamente por 2min

e centrifugado a 8 000rpm a 4°C por 30min. Por fim, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e mantido no frio durante a determinação da quantidade de enzimas.

3.7.1. Ascorbato peroxidase (APX)

Para a análise de APX, a 200µL do sobrenadante obtido conforme descrito previamente adicionou-se 2800µL de solução de leitura composta por tampão fosfato de potássio com 0,220g de ácido ascórbico. Leu-se a absorvância a 290nm durante 3 min num nanofotômetro NanoPhotometer (Implen GmbH, Munique, Alemanha). Uma unidade enzima foi definida como uma diminuição na absorvância em 0.001/min.

3.7.2. Guaiacol peroxidase (POX)

A POX foi quantificada juntando-se a 100µL de sobrenadante 450µL de 1% guaiacol e 450µL de 17mM H₂O₂. Leu-se a absorvância da amostra a 510nm durante 1 min num nanofotômetro NanoPhotometer (Implen GmbH, Munique, Alemanha) e uma unidade de atividade enzimática foi definida como um aumento na absorvância de 0,001/min.

3.8. Quantificação da lenhina

Para a quantificação de lenhina, 0,1g de amostra liofilizada foi sucessivamente lavada com 5mL de metanol, água ultrapura, acetona e hexano por períodos de 24h. Após este processo secou-se as amostras a 60°C durante 72h e pesou-se cerca de 10mg de amostra para um microtubo de 2mL. Adicionou-se 1mL de brometo de acetila 12,5% e deixou-se a digerir a 50°C por 2h com agitação vigorosa. De seguida as amostras foram centrifugadas durante 5 min a 13 300rpm e recolheu-se 100µl do sobrenadante para um novo microtubo contendo 200µl de ácido acético e 150mL NaOH 0.3M. Por fim adicionou-se 50µl de cloridrato de hidroxilamina 0.5M e 500µl de ácido acético, misturando-se bem. A absorvância das amostras foi depois registada num nanofotômetro NanoPhotometer (Implen GmbH, Munique, Alemanha) a 280nm. A quantidade de lenhina em cada amostra foi determinada com uma curva de calibração de lenhina.

3.9. Quantificação de fenólicos Solúveis Totais

Da extração resultante da adição de 5mL de metanol do protocolo da secção anterior, 100µl do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para tubos de centrífuga de 15mL onde se adicionou 5mL de água destilada e 500µL de reagente de Folin-Denis. Após agitação vigorosa deixou-se que a reação ocorresse durante 5 min. Foram depois adicionados 1,5mL de carbonato de sódio a 20% e deixou-se a reagir no escuro durante 2h. Por fim adicionou-se 2,9mL de água destilada e leu-se a absorvância a 760nm num nanofotómetro NanoPhotometer (Implen GmbH, Munique, Alemanha). A quantificação foi feita através de uma curva de calibração de quercetina.

3.10. Quantificação de flavonóides totais

Para a estimativa de flavonóides totais começou-se por dissolver 10mg de amostra em 0,5mL de etanol a 80%. De seguida misturou-se a mostra com 1,5mL de etanol a 95%, 0,1mL de cloreto de alumínio a 10%, 0,1mL de acetato de potássio 1M e 2,8mL de água destilada e incubou-se por 30min à temperatura ambiente. Por fim foram lidas as absorvâncias a 415nm nanofotómetro NanoPhotometer (Implen GmbH, Munique, Alemanha) e a concentração de flavonóides totais em cada amostra determinada através de uma curva de calibração de quercetina.

3.11. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados foi levada a cabo com recurso ao software GraphPad Prism v6.0 através da análise de variância (ANOVA) com $p < 0.05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Ensaio I – Influência da densidade do inóculo na severidade da doença

4.1.1. Determinação de unidades formadoras de colônias (UFC)

Após a infecção da planta através de aberturas naturais e feridas, as bactérias começam a migrar dentro do sistema vascular induzindo uma grande variedade de sintomas da doença, que podem variar desde a manchas foliares até à formação de cancrios (Ferrante *et al.*, 2012). Considera-se que a PSA tem uma fase biotrófica assintomática, durante a qual coloniza a planta sem causar sintomas aparentes, seguida de uma fase necrotrófica. Esta ocorre quando a bactéria consegue superar com sucesso os mecanismos de defesa da planta, que se caracteriza pela degradação do tecido e o aparecimento dos sintomas da doença (Petriccione *et al.*, 2014). Por outro lado, a PFM não é sistêmica, e está associada apenas a sintomas nas folhas não conduzindo à morte da planta infetada (Cunty *et al.*, 2014).

Neste trabalho verificou-se que as plantas inoculadas com uma baixa densidade de inóculo (DI) de PSA apresentaram colonização bacteriana apenas dois dpi, sendo que as plantas 'Hayward' apresentaram significativamente maior densidade bacteriana, com $2,43 \times 10^3 \pm 0,33$ UFC/mL, do que as plantas 'Ken's Red', com $0,35 \times 10^3 \pm 0,06$ UFC/mL (Fig. 6A).

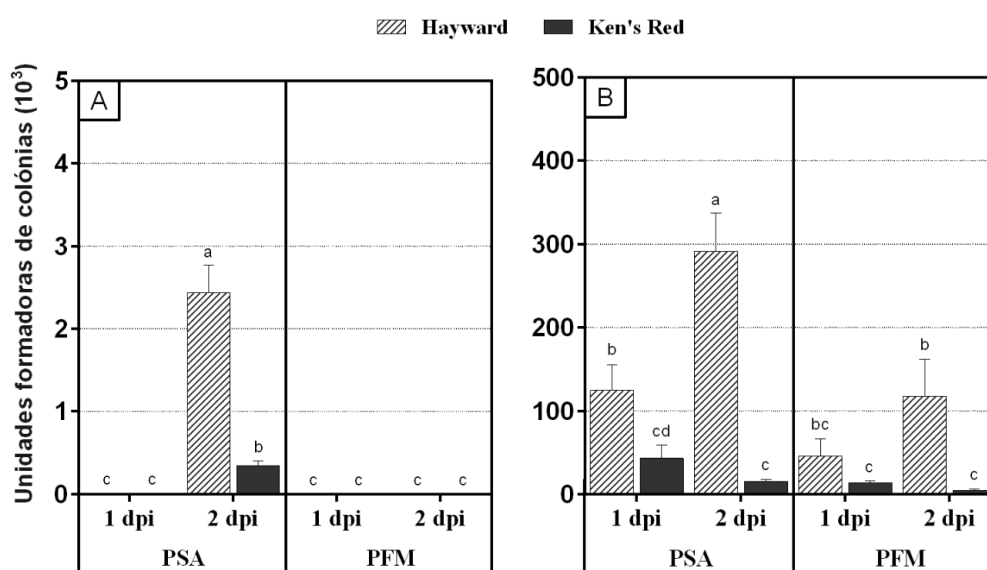


Figura 6 - Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em plantas 'Hayward' e 'Ken's Red' artificialmente inoculadas com uma baixa densidade de inóculo (A) e com uma alta densidade de inóculo (B) de PSA ou PFM, 1 e 2 dias pós inoculação (dpi). Cada barra representa a média de três réplicas biológicas e a linha vertical representa o erro padrão. Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes a $p < 0.05$.

Nas plantas inoculadas com baixa DI de PFM não foram detetadas colónias bacterianas durante o período experimental, independentemente da cultivar. Em contraste, nas plantas inoculadas com uma alta DI foi detetada colonização bacteriana logo após 1 dpi, tendo as plantas 'Hayward' apresentado maior colonização bacteriana independentemente do dia de análise ou da estirpe bacteriana (Fig. 6B). Nesta cultivar a densidade de PSA aumentou de $125 \times 10^3 \pm 31$ UFC/mL 1 dpi para $291 \times 10^3 \pm 46$ UFC/mL 2 dpi, o que representa um incremento de 132%, e a de PFM aumentou 156%, passando de $46 \times 10^3 \pm 20$ UFC/mL 1 dpi para $118 \times 10^3 \pm 44$ UFC/mL 2 dpi. Nas plantas 'Ken's Red' a densidade de bactéria nos tecidos foi consistentemente inferior, havendo, inclusivamente, uma tendência para a sua diminuição ao longo do tempo. De facto, a densidade de células bacterianas diminuiu de $43 \times 10^3 \pm 16$ UFC/mL 1 dpi para $15 \times 10^3 \pm 3$ UFC/mL 2 dpi para a PSA e de $14 \times 10^3 \pm 2$ UFC/mL 1 dpi e $4 \times 10^3 \pm 2$ UFC/mL 2 dpi, o que representa um decréscimo de 65% e 71%, respetivamente, apesar de não significativo.

Estes resultados demonstram que a taxa de colonização bacteriana é altamente dependente da espécie da planta, e que a espécie *A. deliciosa* é muito mais suscetível à infeção por PSA e PFM do que *A. arguta*. Até à data, as informações acerca do grau de suscetibilidade das várias cultivares de kiwi às diferentes estirpes de PSA e PFM são bastante escassas, tendo por base maioritariamente dados empíricos e informações de campo dispersas ou incompletas. A padronização dos dados e a comparação efetiva da suscetibilidade de cada cultivar ao CBK é, assim, muito difícil, uma vez que as informações disponíveis envolvem diferentes cultivares a serem infetadas por estirpes de PSA e PFM distintas sob condições climáticas bastante diferentes. Assim, este é o primeiro estudo a demonstrar sob condições de infeção e de manutenção geral conhecidas a maior suscetibilidade de 'Hayward' à PSA e PFM, comparativamente com 'Ken's Red'. Spinelli *et al.* (2011) mostraram que a PSA poderia penetrar a superfície da folha através de tricomas danificados, considerando ainda que esses tricomas poderiam proporcionar um ambiente favorável para o crescimento bacteriano. Esses autores observaram que as cultivares de *A. chinensis* possuíam maior densidade de tricomas em comparação com as de *A. deliciosa*, que por sua vez possuíam tricomas mais densos que *A. arguta*, suspeitando que a presença de um elevado número de tricomas pudesse contribuir para a maior suscetibilidade das cultivares de *A. chinensis* e *A. deliciosa*. Deste modo, a rápida colonização dos tecidos das plantas 'Hayward' pelas estirpes bacterianas utilizadas neste estudo pode dever-se em grande parte à sua anatomia foliar; no entanto, o papel de outros fatores fisiológicos e metabólicos relacionados com a planta não deve ser descartado.

A taxa de colonização da PSA foi bastante superior durante todo o período experimental do que a PFM. Sabe-se que diferentes estirpes bacterianas com graus de virulência reconhecidamente distintos são capazes de infectar as espécies de *Actinidia* em diferentes extensões e velocidades de colonização dos tecidos vegetais (Scortichini *et al.*, 2012). Testes realizados por Chapman *et al.* (2012) e Cunty *et al.* (2014) demonstram a existência de diferenças nas características fenotípicas, moleculares e de patogenicidade e de efectores distintos para estas duas populações de *Pseudomonas*. Análises filogenéticas de genes de referência (*gapA*, *gltA*, *gyrB*, *rpoD*) mostraram que as populações de Psa1, Psa2 e Psa3 apresentam maior proximidade com *P. s. pv. theae* do que com estirpes de PFM, existindo assim uma clara distinção genética entre as duas patovares bacterianas usadas neste estudo. Os genes efectores do tipo III (*hop*, *hrp* e genes *avr*) permitem que as bactérias *P. syringae* interajam com a planta, codificando proteínas que são injetadas nas células vegetais pelo sistema de secreção de tipo III e tendo, portanto, um papel importante na virulência do patogénio (Chapman *et al.* 2012). O gene efector *avrE1*, em particular, mostrou o maior número de diferenças entre os alelos de Psa3 e PFM. Curiosamente, *avrE1* mostrou ter um papel importante na virulência em *P. syringae pv. tomato*. (Chapman *et al.* 2012). Badel *et al.* (2006) mostraram que o gene *avrE1* promove a formação de lesões dentro das células vegetais e que as ações combinadas de *avrE1* e *hopM1* são particularmente importantes na promoção do crescimento bacteriano em plantas de tomate. Tanto a estirpe Psa3 como a PFM não produzem coronatina nem faseolotoxina, sendo que a sua maior/menor agressividade poderá ser explicada pelas diferenças anteriormente referidas.

Foi possível ainda verificar que a densidade do inóculo também tem efeito no grau de colonização de ambas as estirpes bacterianas, visto que com uma densidade elevada o estabelecimento tanto da PSA como da PFM nos tecidos da plantas ocorreu imediatamente após a aplicação do inóculo, enquanto que a baixas densidades a colonização só foi detetada dois dias após a inoculação.

4.1.2. Análise da expressão de genes APX, CAT, SOD, LOX1, SAM e TLP1

A expressão de genes codificadores de enzimas antioxidantes já mostrou desempenhar um papel muito importante durante a defesa contra a infeção por PSA (Petriccione *et al.* 2015).

Neste trabalho, a expressão do gene *APX* permaneceu inalterada durante o período experimental nas plantas 'Hayward', independentemente da densidade do

inóculo e da estirpe bacteriana (Fig. 7A). É possível que nesta cultivar a ativação do gene *APX* possa ocorrer após os 2 dpi. De facto, Petriccione *et al.* (2015) verificaram que a transcrição deste gene dependia fortemente da densidade de inóculo, com os valores mais elevados de transcrição a ocorrer 4 e 10 dpi. No entanto, nas plantas 'Ken's Red' inoculadas com PSA os valores de expressão relativa foram de ca. $1,8 \pm 0,26$ nas plantas inoculadas com PSA 1 dpi, enquanto que nas plantas inoculadas com PFM este valor foi de apenas $0,9 \pm 0,16$, o que corresponde ao nível basal de expressão genética (Fig. 7B). Houve, então, um aumento de quase 100% do valor de expressão relativa do gene *APX* após inoculação com PSA, comparativamente com a PFM, o que demonstra que as diferentes estirpes bacterianas têm impactos distintos na ativação das defesas antioxidantes. De facto, a expressão deste gene foi tanto maior quanto a densidade de células bacterianas nos tecidos das plantas expostas à PSA podendo ser que a ativação deste gene seja um dos mecanismos de defesa que conduz a uma maior tolerância das plantas 'Ken's Red' contra a PSA.

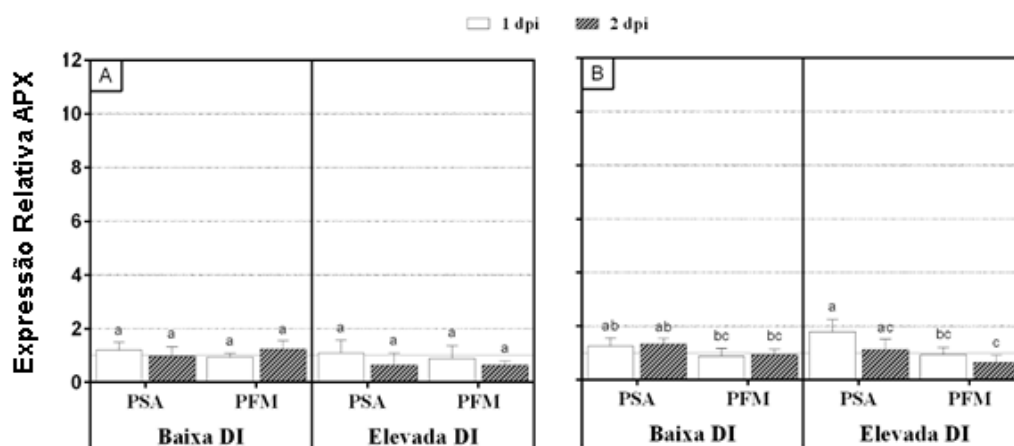


Figura 7 - Análise de expressão do gene *APX* em plantas 'Hayward' (A) e Ken's Red' (B) 1 e 2 dias pós inoculação artificial com uma de duas densidades de inóculo (DI) distintas de PSA ou PFM. Cada barra representa a média de três réplicas biológicas e a linha vertical representa o erro padrão. Como controlo foram utilizados os genes actina (ACT) e proteína fosfatase 2A (PP2A). Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes a $p < 0.05$.

De forma idêntica ao gene *APX*, a expressão do gene *CAT* não demonstrou alterações significativas ao longo do período experimental nas plantas 'Hayward', independentemente do tipo de inóculo (Fig. 8A). É possível que nesta cultivar a ativação das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase e catalase ocorra numa fase posterior da doença. A sobre-expressão do gene *CAT* foi já observada em plantas 'Hayward' com dois anos de idade, mantidas em condições de vaso, mas apenas 7 dpi (Petriccione *et al.* 2015). As plantas 'Ken's Red' inoculadas com baixa DI de PFM apresentaram um aumento significativo de 42% na expressão relativa do gene *CAT* de 1 dpi para 2 dpi, a qual aumentou de $1 \pm 0,09$ (valor considerado basal) para $1.7 \pm 0,38$ durante o período

experimental (Fig. 8B). Estes resultados demonstram novamente que a ativação do mecanismo antioxidante é fortemente dependente não só da cultivar, mas também da estirpe bacteriana que a coloniza sendo a expressão deste gene um dos mecanismos de defesa eficientes nas plantas ‘Ken’s Red’ quando expostas a baixas concentrações tanto de PSA como PFM.

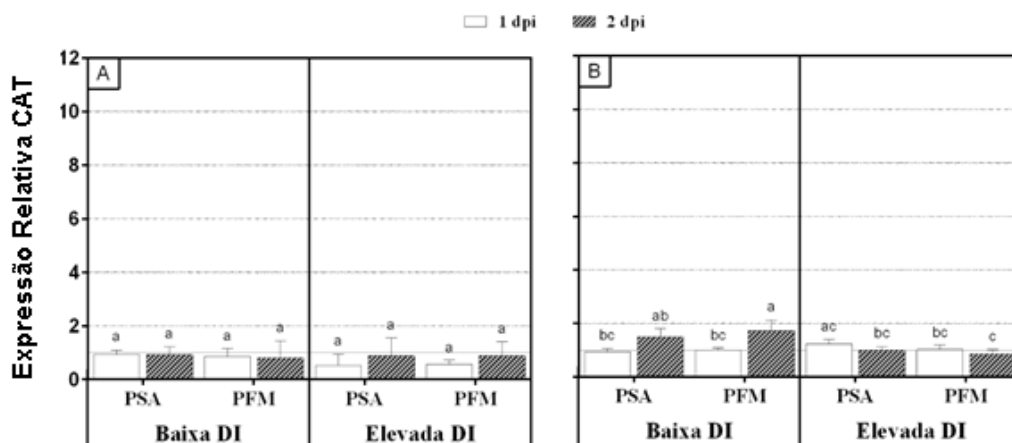


Figura 8 - Análise de expressão do gene *CAT* em plantas ‘Hayward’ (A) e ‘Ken’s Red’ (B) 1 e 2 dias pós inoculação artificial com uma de duas densidades de inóculo (DI) distintas de PSA ou PFM. Cada barra representa a média de três réplicas biológicas e a linha vertical representa o erro padrão. Como controle foram utilizados os genes actina (ACT) e proteína fosfatase 2A (PP2A). Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes a $p < 0.05$.

Ao contrário do observado para os genes *APX* e *CAT*, relativamente à expressão do gene *SOD* os resultados mais expressivos foram obtidos para a cultivar ‘Hayward’ (Fig. 9). De facto, observou-se a sobre expressão deste gene logo após 1 dpi com elevada DI, a qual continuou a aumentar durante o período experimental, independentemente na estirpe bacteriana. Nas plantas ‘Hayward’ inoculadas com elevada densidade de PSA o aumento da expressão relativa deste gene foi de 53%, passando de $2,2 \pm 0,49$ para $4,8 \pm 0,74$, enquanto que nas plantas inoculadas com elevada densidade de PFM este aumento foi de 50%, sendo de $1,7 \pm 0,45$ 1 dpi e aumentando para $3,4 \pm 0,64$ 2 dpi (Fig. 9A). Estes resultados demonstram que a expressão do gene *SOD* é um dos mecanismos relevantes na defesa das plantas ‘Hayward’ quando expostas a altas densidades de tanto PSA como PFM.

É possível, então, concluir que a ativação de genes responsáveis pela codificação de enzimas antioxidantes é bastante distinta entre plantas *A. deliciosa* e *A. arguta*, pelo menos nos tempos analisados. Enquanto que a expressão relativa dos genes *APX* e *CAT* parece ser alterada com mais expressividade em ‘Ken’s Red’, em ‘Hayward’ o gene *SOD* foi o que demonstrou ser mais sobre expresso.

As principais moléculas que sinalizam a ativação de genes relacionados com a defesa das plantas são o ácido salicílico (AS), o ácido jasmónico (AJ) e o etileno (ET)

(Walters, 2011). Estas hormonas têm múltiplos papéis na planta e têm funções importantes na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. Em muitos casos, a infeção por patógenos está associada a uma maior produção destas hormonas e a uma ativação adicional de genes relacionados com a defesa. Além disso, a aplicação exógena destes compostos nas plantas leva geralmente a um aumento da resistência aos agentes patogénicos (Walters, 2011).

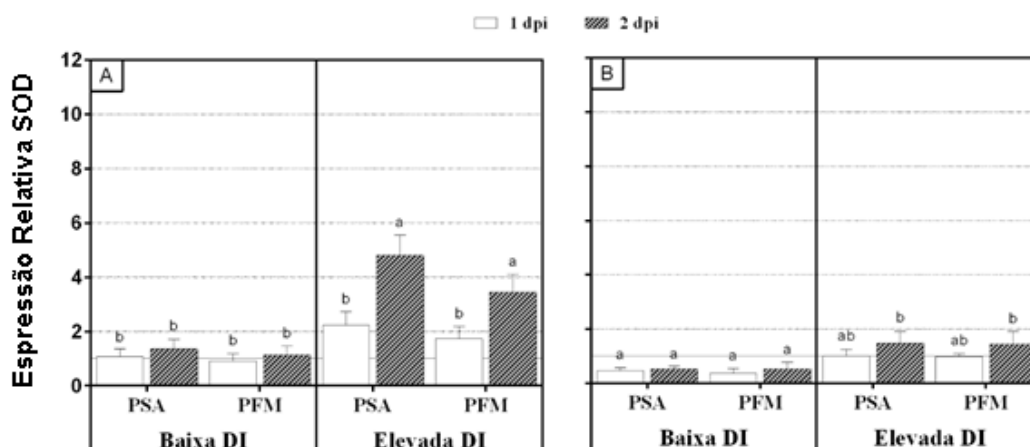


Figura 9 - Análise de expressão do gene *SOD* em plantas 'Hayward' (A) e 'Ken's Red' (B) 1 e 2 dias pós inoculação artificial com uma de duas densidades de inóculo (DI) distintas de PSA ou PFM. Cada barra representa a média de três réplicas biológicas e a linha vertical representa o erro padrão. Como controlo foram utilizados os genes actina (*ACT*) e proteína fosfatase 2A (*PP2A*). Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes a $p < 0.05$.

O gene *LOX1* codifica uma lipoxigenase envolvida na síntese de ácidos gordos oxigenados, os quais são metabolizados em compostos como o ácido jasmónico e aldeídos. Estes compostos possuem funções fisiológicas no crescimento e desenvolvimento, senescência e respostas de defesa induzidas por feridas e patógenos (Kolomiets *et al.*, 2000).

Neste estudo verificou-se que a expressão relativa do gene *LOX1* aumentou de forma significativa nas plantas 'Hayward' de 1 para 2 dpi, tendo este aumento sido de 45% após inoculação com baixa densidade de PSA e 34% nas plantas inoculadas com elevada densidade desta estirpe (Fig. 10A). Em particular, nas plantas desta cultivar inoculadas com elevada densidade de PSA a expressão relativa de *LOX1* estava já aumentada em 47% 1 dpi relativamente ao nível de expressão considerado basal (1). Inversamente, nas plantas 'Ken's Red' verificou-se uma diminuição da expressão relativa do gene *LOX1* de 74% de 1 dpi para 2 dpi nas plantas inoculadas com baixa densidade de PSA, enquanto que as plantas 'Ken's Red' inoculadas com elevada densidade desta estirpe bacteriana apresentaram um aumento de 780% na expressão relativa deste gene, de 1 para 2 dpi, a qual subiu de $0,23 \pm 0,04$ para $1,8 \pm 0,49$ (Fig

10B). Nas plantas inoculadas com PFM não se verificaram alterações significativas ao longo do período experimental, independentemente da densidade de inóculo e cultivar.

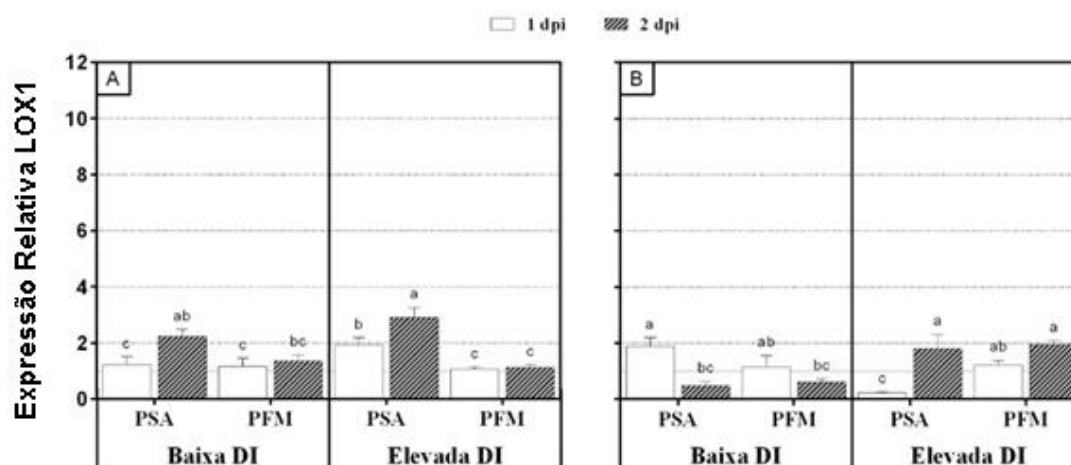


Figura 10 - Análise de expressão do gene *LOX1* em plantas 'Hayward' (A) e 'Ken's Red' (B) 1 e 2 dias pós inoculação artificial com uma de duas densidades de inóculo (DI) distintas de PSA ou PFM. Cada barra representa a média de três réplicas biológicas e a linha vertical representa o erro padrão. Como controle foram utilizados os genes actina (ACT) e proteína fosfatase 2A (PP2A). Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes a $p < 0.05$.

A baixa expressão de *LOX1* nas plantas 'Ken's Red' poderá ser um dos fatores que confere a maior tolerância desta cultivar à PSA. De facto Cellini *et al.* (2014) verificaram que a maior atividade da via do ácido jasmônico diminui a atividade da via do ácido salicílico e induz o aumento da suscetibilidade de plantas 'Hayward' ao patógeno. Daí que a inativação ou diminuição dos precursores desta via possa ser uma estratégia das plantas *A. arguta* para impedir a progressão do patógeno. Por outro lado, o aumento da regulação do gene *LOX1* em plantas Hayward, principalmente após a inoculação com elevada densidade de PSA, pode ser um mecanismo de virulência desta estirpe bacteriana por forma a contrapor os mecanismos de resposta da planta.

O gene *SAM* codifica a síntese de S-adenosilmetionina (SAM) que possui várias funções nos tecidos vegetais, como doador do grupo metilo para quase todas as reações biológicas de metilação ou precursor de metabolitos como etileno, poliaminas e vitamina B1 (Palmieri *et al.*, 2006; Hoefgen *et al.*, 2003).

A expressão relativa do gene *SAM* aumentou de forma significativa de 1 para 2 dpi nas plantas inoculadas com elevada densidade de PFM, tendo sido este aumento de 131% para 'Hayward' e de 115% para 'Ken's Red'. Após inoculação de 'Ken's Red' com baixa densidade de PSA, a expressão relativa do gene *SAM* aumentou 124% 1 dpi, comparativamente com a expressão considerada basal, atingindo um valor de expressão relativa de $2,2 \pm 0,47$, o qual diminuiu ao longo do período experimental até

níveis próximos dos basais. A tendência inversa foi observada nas plantas desta cultivar inoculadas com uma elevada densidade de PSA, nas quais a expressão relativa do gene SAM aumentou 115% ao longo do período experimental. Foi já demonstrado que a aplicação exógena de etileno aumenta a incidência da doença (Cellini *et al.* 2014), daí que a ativação da expressão do gene SAM possa ser resultado não da ativação dos mecanismos defensivos da planta, mas sim da indução de vias suas antagonistas por parte das bactérias invasoras. De facto, a expressão deste gene foi tanto maior quanto a densidade de células bacterianas nos tecidos das plantas (Fig. 6) e foi tendencialmente superior em 'Hayward', comparativamente com 'Ken's Red', principalmente após inoculação com elevada densidade de inóculo.

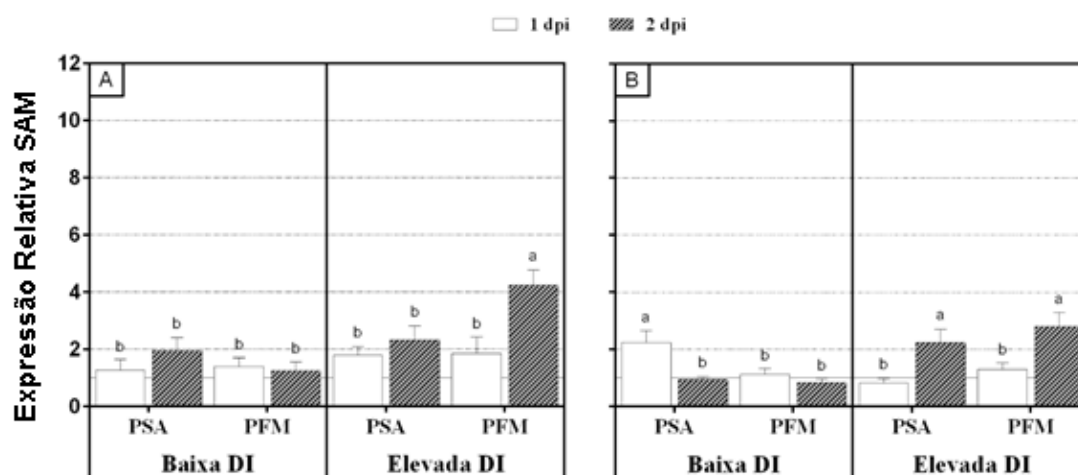


Figura 11 - Análise de expressão do gene SAM em plantas 'Hayward' (A) e 'Ken's Red' (B) 1 e 2 dias pós inoculação artificial com uma de duas densidades de inóculo (DI) distintas de PSA ou PFM. Cada barra representa a média de três réplicas biológicas e a linha vertical representa o erro padrão. Como controlo foram utilizados os genes actina (ACT) e proteína fosfatase 2A (PP2A). Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes a $p < 0.05$

O gene *TLP1* codifica uma proteína semelhante à taumatina, a qual pertence à família de proteínas relacionadas com patogénese (proteínas PR), e está envolvida na resistência adquirida e na resposta ao stress nas plantas (Cellini *et al.*, 2014). Os níveis constitutivos da proteína taumatina são tipicamente baixos em plantas saudáveis, sendo a sua síntese induzida exclusivamente em resposta a danos mecânicos ou a ataques de patogénios. Embora a função específica de muitas proteínas PR nas plantas seja desconhecida, elas estão envolvidas na resistência sistémica adquirida e em resposta a stress biótico, causando a inibição do crescimento de hifas e redução da germinação

de esporos, provavelmente por um mecanismo de permeabilização da membrana e/ou pela interação com recetores de patogénios (Borad *et al.*, 2008).

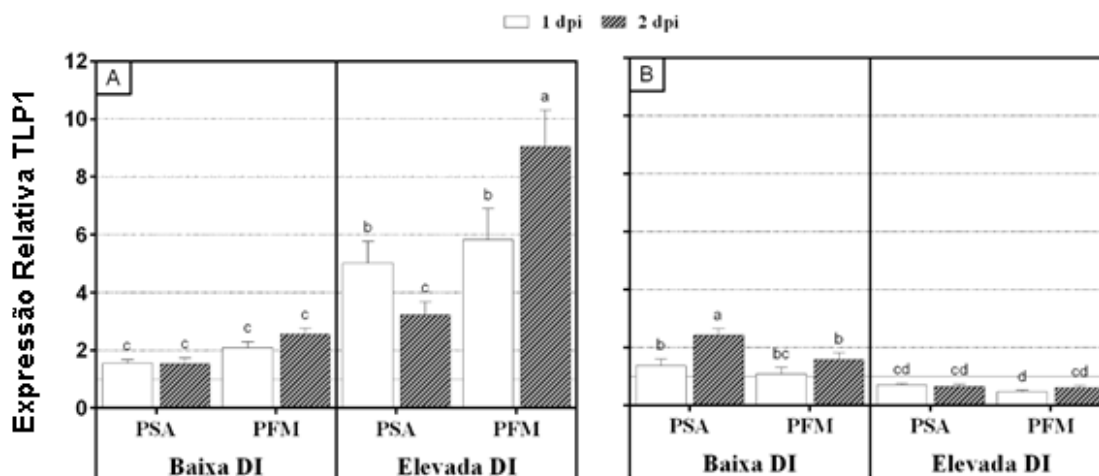


Figura 12 – Análise de expressão do gene *TLP1* em plantas ‘Hayward’ (A) e Ken’s Red’ (B) 1 e 2 dias pós inoculação artificial com uma de duas densidades distintas de PSA ou PFM. Cada barra representa a média de três réplicas biológicas e a linha vertical representa o erro padrão. Como controlo foram utilizados os genes actina (ACT) e proteína fosfatase 2A (PP2A). Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes a $p < 0.05$.

Nas plantas ‘Hayward’ inoculadas com baixa densidade de PSA não se verificaram alterações significativas na expressão relativa do gene *TLP1* ao longo do período experimental (Fig. 12A). No entanto, após inoculação das plantas com elevada densidade de inóculo, a expressão relativa deste gene aumentou substancialmente logo após 1 dpi, comparativamente com as plantas controlo, tendo este aumento sido de 402% após inoculação com PSA e 482% após inoculação com PFM. No entanto, enquanto que nas plantas inoculadas com PSA a expressão relativa do gene *TLP1* decresceu de $5,0 \pm 0,76$ para $3,2 \pm 0,45$ (isto é, 34%) ao longo do tempo, após inoculação com PFM a expressão relativa deste gene aumentou de $5,8 \pm 1,07$ para $9,1 \pm 1,26$ o que representa um incremento de 59%. A alteração da expressão relativa do gene *TLP1* foi menos expressiva nas plantas ‘Ken’s Red’, nas quais apenas nas plantas inoculadas com baixa densidade de PSA se verificou um aumento significativo de 85% ao longo do período experimental (Fig. 12B). É possível verificar novamente que a alteração da expressão de genes relacionados com a capacidade defensiva das plantas é altamente dependente tanto da cultivar como da estirpe bacteriana e respetiva densidade. O gene *TLP1* parece ter um papel bastante significativo na capacidade de defesa das plantas ‘Hayward’ aquando da presença de uma elevada densidade de inóculo. É possível que na cultivar ‘Ken’s Red’ outras proteínas relacionadas com a patogénese tenham um papel mais preponderante na defesa contra a infeção por PSA e PFM.

Estudos levados a cabo por Petriccione *et al.* (2014) através da análise do apoplasto de folhas de *Actinidia deliciosa* durante a colonização biotrófica por PSA permitiram destacar algumas proteínas que estão consistentemente envolvidas no impedimento do estabelecimento de sintomas foliares provocados pela bactéria. Estes autores verificaram que apesar do pico de densidade populacional do patógeno ter ocorrido aos 6 dpi, a proteína peroxidase 4 e as proteínas de choque térmico apareceram em concentrações superiores nos primeiros dias da colonização de bacteriana. Contrariamente, as quitinases e as proteínas PR foram induzidas a partir de então e contribuíram para conter o número de células microbianas no apoplasto, provavelmente por forma a evitar uma maior incidência da doença. Enquanto que o presente estudo foi realizado em plantas *in vitro*, no realizado por Preticcione *et al.*, (2014) foram utilizadas plantas de vaso com dois anos de idade, o que poderá explicar esta diferença no tempo de ação das proteínas PR estudadas.

4.2. Ensaio II – Avaliação dos mecanismos de defesa contra a PSA

As resistências específicas das várias cultivares às bactérias patogénicas, estão tipicamente associadas à resposta hipersensitiva (RH), que se caracteriza pela morte rápida das células hospedeiras no local da infeção, contribuindo para limitar o crescimento e a disseminação da bactéria invasora (Buonaurio, 2008). A sobreprodução de EROs é um dos eventos iniciais que caracteriza a RH induzida por bactérias, que, pelo menos em parte, pode gerar condições desfavoráveis para a multiplicação bacteriana no apoplasto. Para além das EROs, outras moléculas antibacterianas, como por exemplo fenóis e quitinases, podem ser responsáveis pela restrição do crescimento bacteriano observado durante a RH. Enquanto que os fenólicos modificam os polissacarídeos das paredes celulares para que as plantas sejam capazes de resistir à ação das enzimas líticas, as quitinases conseguem hidrolisar as paredes das células bacterianas. Adicionalmente, a acumulação de lenhina e as alterações no potencial hídrico no apoplasto são possíveis mecanismos de resistência pós-infeção (Buonaurio, 2008).

Após a avaliação do impacto da inoculação com densidades de inóculo distintas de duas cultivares de kiwi com diferente suscetibilidade ao CBK, pretendeu-se avaliar o comportamento de alguns metabolitos durante o processo de infeção. Como foi detetada colonização bacteriana logo após 1 dpi apenas com a DI mais elevada, independentemente da estirpe bacteriana, avaliou-se a acumulação de pigmentos

fitossintéticos, enzimas antioxidantes e compostos fenólicos apenas nas plantas expostas a esta concentração de inóculo.

A clorose provocada pela infecção com um agente patogénico é normalmente caracterizada pela perda de clorofila e pelo declínio progressivo na capacidade fotossintética das plantas. Isto faz com que a análise dos pigmentos fotossintéticos seja uma importante ferramenta para avaliação da saúde das células vegetais, sendo encarada como uma medida do estado fisiológico geral da planta.

Após inoculação das plantas 'Hayward' com uma elevada densidade de PSA verificou-se que o teor de clorofila total diminuiu de $0,77 \pm 0,04$ para $0,50 \pm 0,06$ mmol/g folha ao longo do período experimental, o que representa um decréscimo de 35% (Fig. 13). Nos restantes tratamentos não se observou alterações significativas na acumulação destes pigmentos, o que é representativo do elevado *stress* a que as plantas 'Hayward' estavam sujeitas quando infetadas com a estirpe bacteriana mais virulenta (Fig. 6).

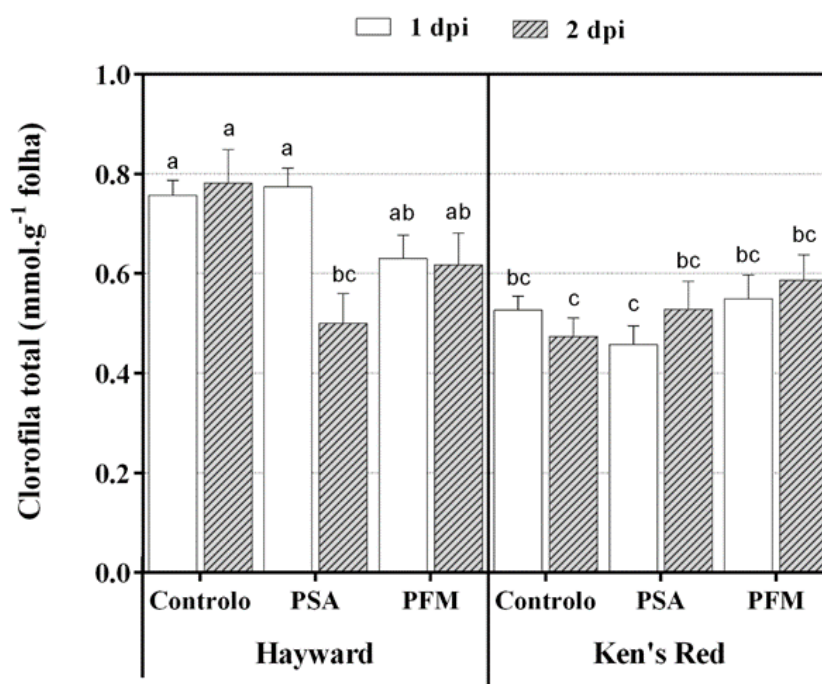


Figura 13 - Concentração de clorofilas totais em plantas 'Hayward' e 'Ken's Red', 1 e 2 dias pós inoculação (dpi) com solução de Ringer (controlo), PSA ou PFM. Cada barra representa a média de três réplicas biológicas e a linha vertical representa o erro padrão. Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes a $p < 0.05$.

Várias patovares de *P. syringae* produzem uma fitotoxina conhecida como coronatina que está relacionada com a maior virulência da patovar. É conhecida também por estar envolvida no desenvolvimento de sintomas, causando um halo clorótico em torno do local da infecção devido à perda de conteúdo de clorofila a e b (Ishiga *et al.*, 2009). A perda de clorofila está correlacionada com uma grande redução na eficiência da fotossíntese devido a uma regulação negativa de genes envolvidos na síntese de

clorofila, proteínas de fotossíntese, proteínas complexas do ciclo de Calvin, bem como devido à indução de clorofilase (Ishiga *et al.*, 2008).

Como visto anteriormente, o ataque de agentes patogénicos, levam a um aumento na produção de EROs nas plantas devido à rutura da homeostasia celular. A eliminação ou desintoxicação das EROs em excesso é conseguida através dum sistema antioxidante eficiente por meio de enzimas antioxidantes e por compostos não enzimático. Dentro do grupo das enzimas antioxidantes pode-se destacar a ação da ascorbato peroxidase (apx), catalase e superóxido dismutase (Sharma *et al.* 2012).

A apx, em particular, é uma enzima fundamental do metabolismo antioxidante, que, como referido anteriormente, catalisa a decomposição do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigénio molecular (O_2) (Uarrota *et al.*, 2016). Neste trabalho, nas plantas controlo a apx apresentou uma atividade de 361 ± 40 U/mg folha 1 dia após a inoculação e 363 ± 5 U/mg 2dpi nas plantas 'Hayward' e 545 ± 49 U/mg 1 dpi e 567 ± 29 U/mg 2 dpi nas plantas 'Ken's Red', o que mostra uma concentração constitutiva superior em mais de 36% na cultivar 'Ken's Red' (Fig. 14). Nas plantas 'Hayward' inoculadas com PSA a atividade da apx foi de 569 ± 51 U/mg 1 dpi e de 518 ± 48 U/mg 2 dpi, o que representa um aumento da atividade desta enzima de 57% e 42%, respetivamente, comparativamente com as plantas controlo. De forma idêntica, nas plantas 'Ken's Red' a concentração de apx após inoculação com PSA foi de 837 ± 50 U/mg 1 dpi e 832 ± 67 U/mg folha 2 dpi, o que representa um aumento de 57% e 47% relativamente às plantas controlo.

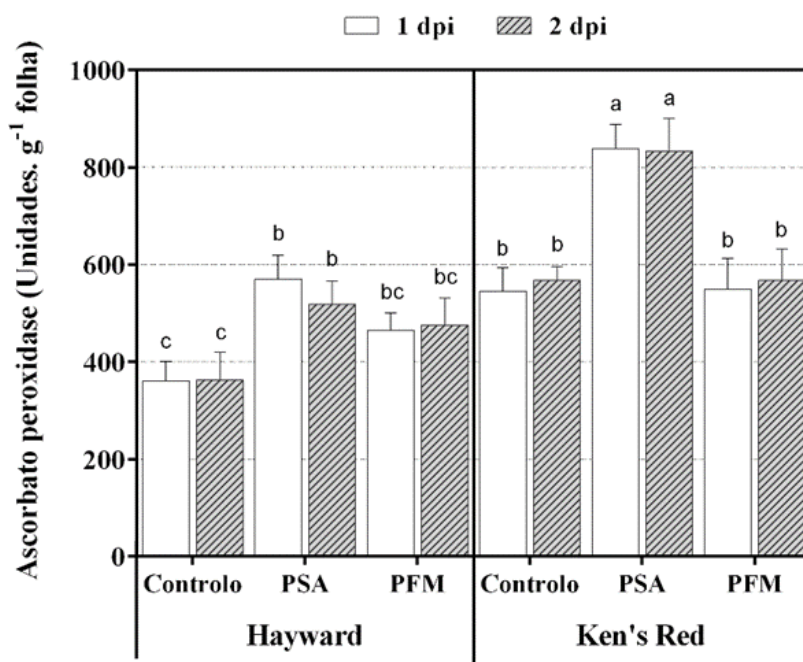


Figura 14 - Concentração da enzima ascorbato peroxidase em plantas 'Hayward' e 'Ken's Red' , 1 e 2 dias pós inoculação (dpi) com solução de Ringer (controlo), PSA ou PFM. Cada barra representa a média de três réplicas biológicas e a linha vertical representa o erro padrão. Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes a $p < 0.05$.

Adicionalmente, as plantas 'Ken's Red' apresentaram concentrações de apx superiores às da cultivar 'Hayward' (entre 47% 1 dpi e 61% 2 dpi), principalmente após inoculação com PSA. Comparando a concentração da enzima apx com a expressão do gene que a codifica (Fig. 7), pode verificar-se que esta enzima parece ter um papel mais ativo nos mecanismos de defesa de *A. arguta* do que de *A. deliciosa*. Não obstante, apesar da expressão relativa do gene *APX* não ter sofrido alterações significativas nas plantas 'Hayward' ao longo do período experimental, a quantidade do metabolito em si teve uma grande variação. Tal indica que a ativação dos mecanismos moleculares de defesa pode ocorrer de forma bastante rápida, podendo ter havido sobre-ativação deste gene antes de 1 dpi. Podemos, então, concluir que a ativação da síntese deste metabolito parece ter um papel bastante ativo tanto nas plantas 'Hayward' como 'Ken's Red' quando expostas à PSA.

As enzimas guaiacol peroxidase (gp) oxidam dadores de eletrões aromáticos, como o guaiacol, à custa de EROs como o H_2O_2 , atuando, assim, como moléculas antioxidantes. A gp pode ser encontrada nos vários tecidos de plantas em vacúolos, na parede celular e no citosol, estando associada a muitos processos biossintéticos importantes, incluindo a lenhificação da parede celular, biossíntese do etileno, cicatrização de feridas e defesa contra *stresses* abióticos e bióticos (Sharma *et al.*, 2012).

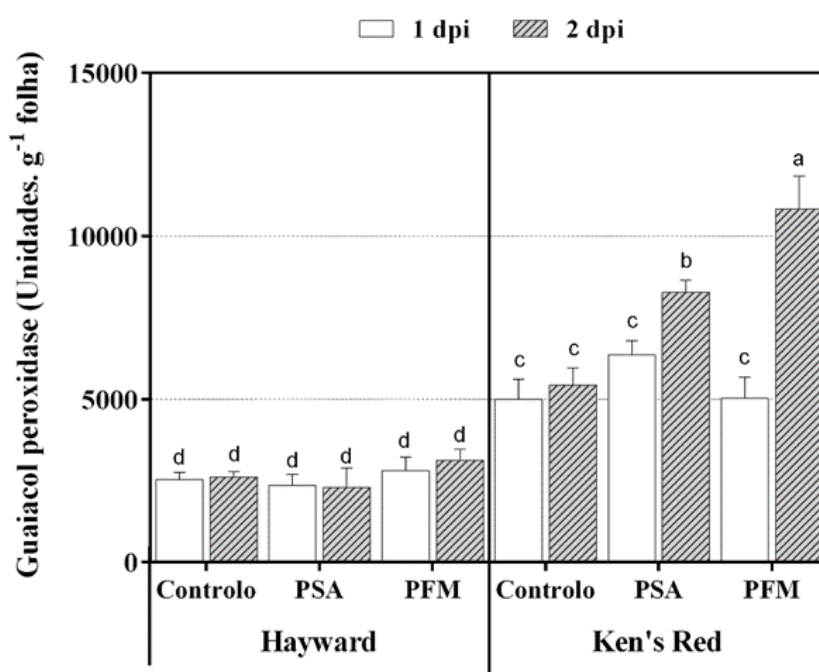


Figura 15 - Concentração da enzima guaiacol peroxidase em plantas 'Hayward' e 'Ken's Red' 1 e 2 dias pós inoculação (dpi) com solução de Ringer (controlo), PSA ou PFM. Cada barra representa a média de três réplicas biológicas e a linha vertical representa o erro padrão. Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes a $p < 0.05$.

A enzima gp não demonstrou variar de forma significativa nas plantas 'Hayward', independentemente do dia de análise e da estirpe bacteriana inoculada (Fig. 15). No entanto, na cultivar 'Ken's Red' houve um aumento significativo na concentração de gp 2 dpi após inoculação com ambas as estirpes bacterianas. De facto, a concentração deste metabolito aumentou 52% e 100% ao longo do período experimental, atingindo valores de $8\,275 \pm 208$ e $10\,828 \pm 578$ U/mg folha após inoculação com PSA e PFM, respetivamente. Adicionalmente, a quantidade desta enzima foi sempre superior nos tecidos das plantas 'Ken's Red', comparativamente com 'Hayward' (entre 97% e 260%). Verifica-se, então, que os mecanismos de defesa no combate à PSA e PFM envolvendo a enzima gp são ativados de forma específica para cada espécie, podendo a sua ativação ser um dos fatores da maior tolerância das plantas 'Ken's Red' tanto à PSA como à PFM.

Os compostos fenólicos são outra grande classe de metabolitos secundários produzidos pelas plantas na defesa contra patógenos. São produzidos principalmente através das vias do ácido xiquímico e ácido malónico e incluem uma grande variedade de compostos relacionados com a defesa, incluindo flavonóides, antocianinas, fitoalexinas, taninos e lenhina (Ghasemzadeh e Ghasemzadeh, 2011).

Após inoculação, verificou-se que a concentração de fenólicos solúveis totais nas plantas 'Hayward' se manteve constante durante todo o período experimental, com valores semelhantes em todos os tratamentos (Fig. 16). Nas plantas 'Ken's Red' houve um aumento significativo de 14% na concentração de fenólicos 1 dpi após inoculação com PSA, o que pode indicar a participação destes compostos na maior capacidade de tolerância desta cultivar ao patógeno. Não obstante, os níveis constitutivos de compostos fenólicos solúveis totais foram sempre bastante superiores em 'Ken's Red' do que em 'Hayward' (entre 126% e 210%), daí que a maior tolerância da cultivar 'Ken's Red' ao CBK possa resultar não só da ativação de determinadas vias de defesa, como também dos elevados níveis constitutivos dos vários metabolitos de defesa.

Um dos genes responsável pela virulência e capacidade da PSA em desativar o sistema de defesa da planta durante a invasão bacteriana é o *hrp*. Lee *et al.* (2015) levaram a cabo estudos onde mostraram que a exposição da bactéria *P. syringae* pv. *tomato* a elevadas concentrações de compostos fenólicos levava a uma diminuição na expressão dos genes *hrp*. Pode, então, inferir-se que uma maior concentração de

compostos fenólicos nos tecidos vegetais poderá aumentar a resistência da planta à PSA e PFM pela inativação do gene *hrp*.

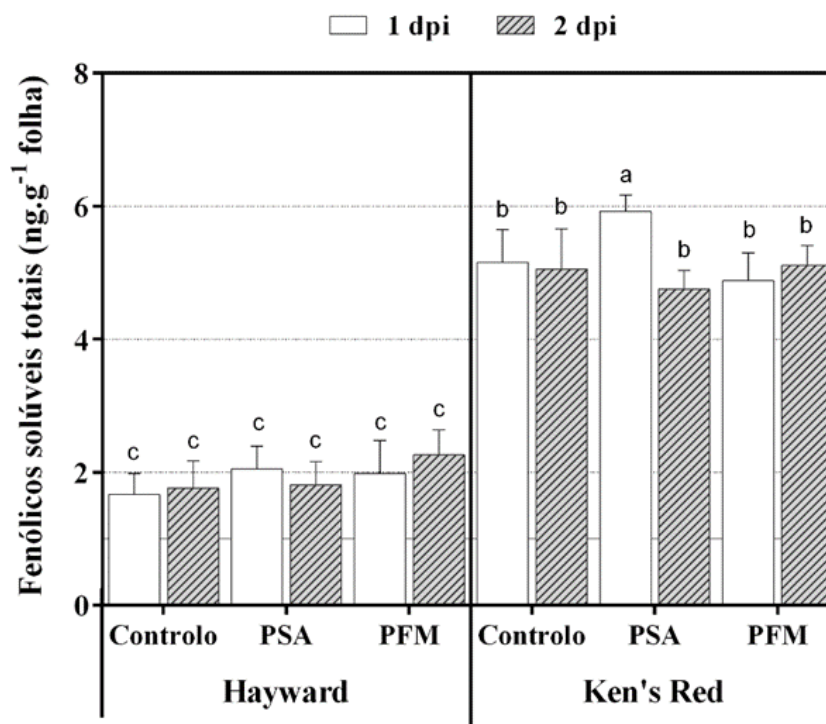


Figura 16 - Concentração de fenólicos solúveis totais em plantas 'Hayward' e 'Ken's Red' 1 e 2 dias pós inoculação (dpi) com solução de Ringer (controlo), PSA ou PFM. Cada barra representa a média de três réplicas biológicas e a linha vertical representa o erro padrão. Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes a $p < 0.05$

A parede celular da planta é uma estrutura dinâmica e complexa, cuja integridade funcional é constantemente monitorizada e mantida durante o desenvolvimento e as interações com o meio ambiente. A lenhina, em particular, é importante para a resposta da planta a *stresses* ambientais, tais como o ataque por patógenos, uma vez que reforça a integridade celular durante a formação da parede celular secundária (Denness *et al.*, 2011). De facto, Denness e seus colaboradores (2011) caracterizaram uma rede genética que permite que as plantas regulem a biossíntese de lenhina em resposta ao dano da parede celular através de interações dinâmicas entre o ácido jasmónico e EROs.

Neste trabalho, a concentração de lenhina variou significativamente nas plantas 'Hayward' 1 dpi, aumentando de $143,9 \pm 11,4$ nas plantas controlo para $204,1 \pm 13,6$ mg/g folha nas plantas inoculadas com PFM, isto é, 36% (Fig. 16). Nas plantas 'Ken's Red' verificou-se um padrão semelhante, mas nas plantas inoculadas com PSA, nas quais a concentração de lenhina aumentou 55% comparativamente com as plantas controlo. Verifica-se, então, que cada cultivar parece ter estratégias de combate específicas para combater a infeção bacteriana, sendo que a ativação da síntese de

lenhina apenas 1 dpi possa ser a causa da PFM não conseguir colonizar as plantas 'Hayward' com a mesma velocidade que a PSA (Fig. 6). Pelo contrário, nas plantas 'Ken's Red' o impedimento da progressão da PFM nos tecidos deve dever-se à síntese de outros metabolitos, uma vez que a síntese de lenhina não sofreu alterações significativas após inoculação com esta estirpe bacteriana, pelo menos durante o período experimental deste trabalho.

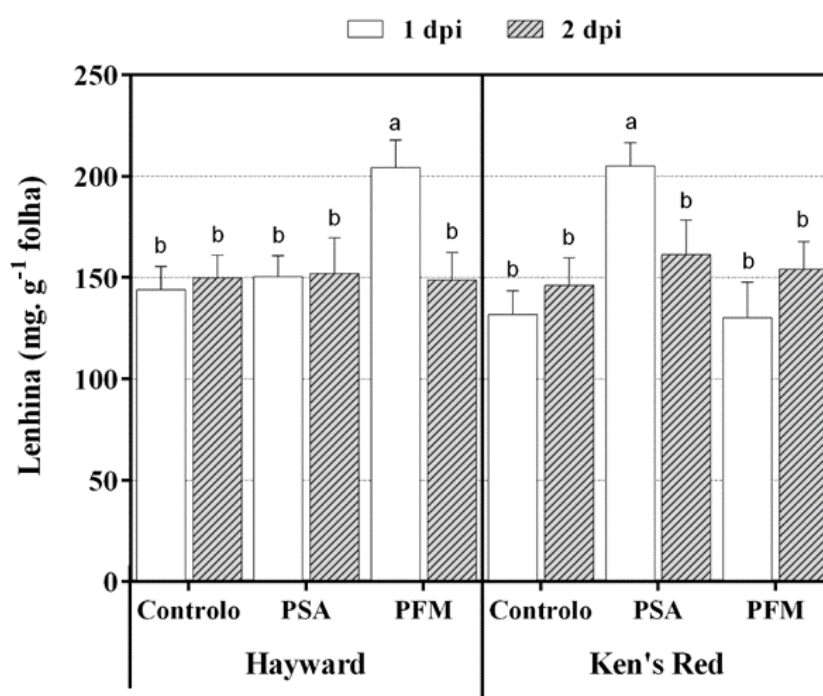


Figura 17 - Concentração de lenhina em plantas 'Hayward' e 'Ken's Red' 1 e 2 dias pós inoculação (dpi) com solução de Ringer (controlo), PSA ou PFM. Cada barra representa a média de três réplicas biológicas e a linha vertical representa o erro padrão. Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes a $p < 0.05$.

Os flavonóides são derivados de fenóis simples e são um dos maiores grupos de metabolitos secundários das plantas. De forma geral, a síntese de flavonóides aumenta após a infeção microbiana da planta, lesões mecânicas, diminuição da temperatura e deficiência de nutrientes (Mierziak *et al.*, 2014). Neste trabalho, nas plantas 'Hayward', a acumulação de flavonóides diminuiu significativamente (ca. 27%) ao longo do período experimental, passando de $2,5 \pm 0,1$ 1 dpi para $1,8 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ folha 2 dpi (Fig 18). Nos restantes tratamentos não se verificaram alterações significativas. Para além das funções fisiológicas e defensivas referidas anteriormente, os flavonóides podem reduzir a produção e extinção de EROs através da inibição de enzimas que geram EROs como a ciclooxygenase, a lipoxigenase e a monooxygenase (Mierziak *et al.*, 2014). A diminuição deste metabolito nas plantas 'Hayward' 2 dpi com PSA pode explicar o aumento da regulação do gene *LOX1* (Figura 10), responsável pela

codificação duma lipoxigenase, e assim contribuir para a maior suscetibilidade desta cultivar a esta estirpe bacteriana.

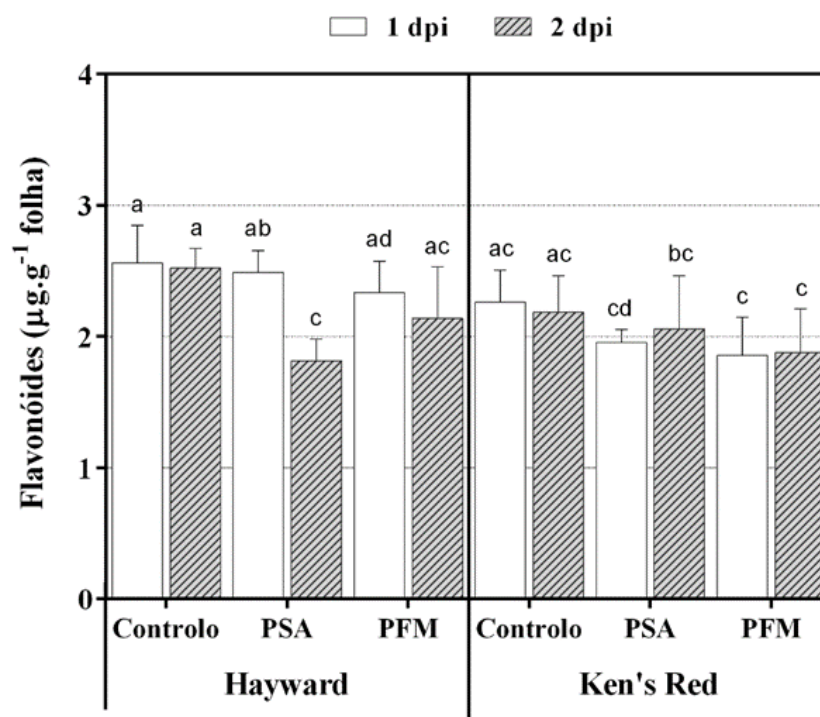


Figura 18 - Concentração de flavonóides em plantas 'Hayward' e 'Ken's Red' 1 e 2 dias pós inoculação (dpi) com solução de Ringer (controlo), PSA ou PFM. Cada barra representa a média de três réplicas biológicas e a linha vertical representa o erro padrão. Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes a $p < 0.05$.

5. Conclusão

As plantas de kiwi *A. deliciosa* cv. 'Hayward' parecem ser muito mais suscetíveis à infecção por PSA e PFM do que as *A. arguta* cv. 'Ken's Red'. Adicionalmente, a tolerância à PSA parece ser o resultado de vários mecanismos de resistência da planta atuando em conjunto contra o patógeno. De facto, enquanto que a expressão dos genes *CAT* e *APX* foi aumentada em 'Ken's Red', em 'Hayward', o gene *SOD* foi o que apresentou maior aumento. Os genes *LOX1* e *SAM*, envolvidos na biossíntese de ácido jasmónico e etileno, respetivamente, foram aumentando até 2 dpi em 'Hayward' e em 1 dpi em 'Ken's Red' para densidades baixas de inóculo, enquanto que com densidades elevadas aumentaram em ambas as cultivares até 2 dpi. A PSA pode induzir a regulação positiva destas vias como parte do seu mecanismo de infecção, afetando a defesa das plantas através de feedback negativo da via do ácido salicílico.

Entre os metabolitos analisados em plantas inoculadas com uma elevada densidade bacteriana, os compostos fenólicos aparentam ter um papel importante na maior tolerância à PSA, apresentando maiores concentrações em plantas inoculadas com PSA, em comparação com o PFM, e nas plantas 'Ken's Red', comparativamente com 'Hayward'. Foi possível ainda verificar que as espécies bacterianas PSA e PFM apresentam diferente grau de virulência, sendo que a PSA a que apresentou maior taxa de colonização dos tecidos vegetais e maior resposta a nível de produção dos metabolismos secundários.

Estes resultados fornecem evidências fundamentais sobre a relação específica entre as diferentes cultivares de *Actinidia* e estirpes de *Pseudomonas* causadoras do CBK.

6. Perspetivas Futuras

Apesar das informações inovadoras obtidas com este trabalho acerca da relação entre as plantas de kiwi e as bactérias responsáveis pelo cancro bacteriano, é necessária investigação adicional por forma a elucidar melhor os mecanismos moleculares implicados na resposta da planta do kiwi à invasão pela PSA e PFM. Em particular, seria interessante levar a cabo novos estudos com diferentes cultivares de kiwi e comparar a suscetibilidade entre cultivares masculinas e femininas e plantas de diferentes idades. É também importante validar os resultados obtidos através de simulações em plantas de campo e de análises de expressão genética e produção de metabolitos em diferentes tempos de análise.

Por fim, devido à escassa informação e/ou informações dispersas e incompletas, seria interessante fazer um levantamento dos danos causados pela PSA em Portugal e a avaliação do impacto económico da mesma.

Bibliografia

- Andolfi, A., Ferrante, P., Petriccione, M., Cimmino, A., Evidente, A., Scortichini, M. (2014). Production of phytotoxic metabolites by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* the causal agent of bacterial canker of kiwifruit. *Journal of Plant Pathology*, 96, 169–176.
- Badel, J. L., Shimizu, R., Oh, H.S., Collmer, A. (2006). A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* avrE1/hopM1 mutant is severely reduced in growth and lesion formation in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interact*, 19, 99-111.
- Balestra, G. M., Mazzaglia, A., Quattrucci, A., Renzi, M., Rossetti, A. (2009). Current status of bacterial canker spread on kiwifruit in Italy. *Australasian Plant Disease*, 4, 34-36.
- Balestra, G.M., Renzi, M., Mazzaglia, A. (2010). First report of bacterial canker of *Actinidia deliciosa* caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Portugal. *New Disease Reports*, 22, 1-10.
- Borad, V., Sriram, S. (2008). Pathogenesis-Related Proteins for the Plant Protection. *Asian Journal Exp. Science*, 22(3), 189-196.
- Buonaurio, Roberto. (2008). Infection and plant defense responses during plant-bacteria interaction. *Plant-Microbe Interactions*, 169-197.
- Cameron, A., Sarojini, V. (2014). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: chemical control. *Plant Pathology*, 63, 1-11.
- Cellini, A., Fiorentini, L., Buriani, G., Yu, J., Donati, I., Cornish, D.A., Novak, B., Costa, G., Vanneste, J.L., Spinelli, F. (2014). Elicitors of the salicylic acid pathway reduce incidence of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Annals of Applied Biology*, 165, 441-453.
- Chapman, J., Taylor, R., Weir, B., Romberg, M., Vanneste, J.L., Luck, J., Alexander, B. (2012) - Phylogenetic relationships among global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Phytopathology*, 102, 1034–1044.
- Cunty, A., Poliakoff, F., Rivoal, C., Cesbron, S., Fischer-Le Saux, M., Lemaire, C., Jacques, M.A., Manceau, C., Vanneste, J.L. (2014). Characterisation of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a de novo pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathology*, 64, 582-596.
- Cunty, A., Poliakoff, F., Rivoal, C., Cesbron, S., Fisher-Le Saux, M., Lemaire, C., Jacques, M.A., Manceau, C., Vanneste, J.L. (2015). Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) isolated from France and assignment of Psa biovar 4 to a de novo pathovar: *Pseudomonas syringae* pv. *actinidifoliorum* pv. nov. *Plant Pathology*, 64, 582-596.
- Denness, L., McKenna, J.F., Segonzac, C., Wormit, A., Madhou, P., Bennett, M. (2016). Cell wall damage-induced lignin biosynthesis is regulated by a reactive oxygen species- and jasmonic acid-dependent process in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 2011, 156, 1364–1374.
- DGAV. (2012). Plano de Ação Nacional para o Controlo da *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* do Kiwi.

- Donati, I., Buriani, G., Cellini, A., Mauri, S., Costa, G., Spinelli, F. (2014). New insights on the bacterial canker of kiwifruit. *Journal of Berry Research*, 4, 53-67.
- DRAPN – Divisão de Proteção e Controlo Fitossanitário. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* - Nova bacteriose da Actinídea.
- DRAPN - Prospeções Fitossanitárias - 2010 a 2016. PSA kiwi
- EPPO, 2012. Pest Risk Analysis for *Pseudomonas syringae* pv. *Actinidiae*. European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris, 50 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAOSTAT 2014
- Félix, A., Cavaco, M. (2004). Caracterização do ecossistema agrário da cultura da actinídea (*Actinidia deliciosa* A. CHEV.) (Actinidiaceae). In VII - Encontro Nacional de Protecção Integrada, Escola Superior Agrária de Coimbra, 1-8.
- Ferrante, P., Fiorillo, E., Marcelletti, S., Marocchi, F., Mastroleo, M., Simeoni, S., Scortichini, M. (2012). The importance of the main colonization and penetration sites of *pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and prevailing weather conditions in the development of epidemics in yellow kiwifruit, recently observed in central Italy. *Journal of Plant Pathology*, 94, 455-461.
- Fideghelli C. (2012). Cultivar di kiwi introdotte nel mondo dal 1980. *Kiwi Informa*, 7-9, 20-29.
- Frampton, R. A., Taylor, C., Moreno, A., Visnovsky, S., Petty, N., Pittman, M., Fineran, P. (2014). Identification of Bacteriophages for Biocontrol of the Kiwifruit Canker Phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Department of Microbiology and Immunology*, 80, 2216–2228.
- Freeman, B.C., Beattie, G.A. 2008. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. *The Plant Health Instructor*, 94.
- Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research* 5.31: 6697-6703.
- García, J.C., García, G., Ciordia, M. (2014). Variedades de kiwi. *Tecnología Agroalimentaria*, 14, 2-7.
- Holger Hesse, Rainer Hoefgen (2003). Molecular aspects of methionine biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 8, 6.
- Instituto Nacional de Estatística - Estatísticas Agrícolas 2016
- Ishiga, Y., Uppalapati, S.R., Ishiga, T., Elavarthi, S., Martin, B., Bender, C. (2008). Involvement of coronatine-inducible reactive oxygen species in bacterial speck disease of tomato. *Plant Signaling & Behavior*, 4, 237-239.
- Ishiga, Y., Uppalapati, S.R., Ishiga, T., Elavarthi, S., Martin, B., Bender, C. (2009). The phytotoxin coronatine induces light-dependent reactive oxygen species in tomato seedlings. *New Phytologist*, 181, 147-160.
- Kolomiets, M.V., Chen, H., Gladon, R.J., Braun, E.J., and Hannapel, D.J. (2000). A Leaf Lipoxygenase of Potato Induced Specifically by Pathogen Infection. *Plant Physiology*, 124, 1121-1130.

- Kulbat, K. (2016). The role of phenolic compounds in plant resistance. *Biotechnol Food Science*, 80, 97-108.
- Lee, J. S., Ryu, H. R., Cha, J. Y., Baik, H. S. (2015). The hrp pathogenicity island of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 is induced by plant phenolic acids. *Journal of Microbiology*, 53, 725–731.
- Maria Dulce Antunes. (2008). *Kiwi: da produção à comercialização*. Universidade do Algarve.
- Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A. (2014). Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment, *Molecules*, 19, 16240-16265.
- Moura, L., Garcia, E., Aguin, O., Ares, A., Abelleira, A., Mansilla, P. (2015). Identificação e caracterização de *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) na Região do Entre Douro e Minho (Portugal). *Revista de Ciências Agrárias*, 38(2), 196-205.
- Nakajima, M., Yamashita, S., Takikawa, Y., Tsuyumu, S. (1995). Similarity of streptomycin resistance gene(s) in *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* with strA and strB of plasmid RSF1010, *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 61, 489-492.
- Palmieri, L., Arrigoni, R., Blanco, E., Carrari, F., Zanor, M.I., Studart-Guimaraes, C., Fernie, A.R., Palmieri, F. (2006). Molecular Identification of an Arabidopsis S-Adenosylmethionine Transporter. Analysis of Organ Distribution, Bacterial Expression, Reconstitution into Liposomes, and Functional Characterization. *Plant Physiology*, 142, 855–865.
- Petriccione, M., Di Cecco, I., Arena, S., Scaloni, A., Scortichini, M. (2012). Proteomic changes in *Actinidia chinensis* shoot during systemic infection with a pandemic *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strain. *Journal of Proteomics*, 78, 461-476.
- Petriccione, M., Salzano, A. M., Di Cecco, I., Arena, S., Scaloni, A., Scortichini, M. (2014). Proteomic analysis of the *Actinidia deliciosa* leaf apoplast during biotrophic colonization by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Journal of Proteomics*, 101, 43-62.
- Petriccione, M., Mastrobuoni, F., Zampella, L., Scortichini, M. (2015). Reference gene selection for normalization of RT-qPCR gene expression data from *Actinidia deliciosa* leaves infected with *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Scientific reports*, 5:16961.
- Scortichini, M., Marcelletti, S., Ferrante, P., Petriccione, M., Firrao, G. (2012). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 13(7), 631-640.
- Scortichini M., (2014). Field efficacy of chitosan to control *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of kiwifruit bacterial canker. *European Journal of Plant Pathology* 140: 887-892.
- Sharma, P., Jha, A., Dubey, R., Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 217037, 26.
- Spinelli, F., Donati, I., Vanneste, J.L., Costa, M., Costa, G. (2011). Real time monitoring of the interactions between *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *Actinidia* species. *Acta Hort.*, 913:461-466.
- Renzi, M., Mazzaglia, A., Balestra, G.M. (2012). Widespread distribution of kiwifruit bacterial canker caused by the European *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* genotype in the main production areas of Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 51, 2, 402-409.

- Takikawa, Y., Serizawa, S., Ichikawa, T., Tsuyumu, S., Goto, M. (1989). *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* pv. nov.: The causal bacterium of canker of kiwifruit in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 55, 437-444.
- Uarrota, V. G., Moresco, R., Schmidt, E. C., Bouzon, Z. L., Nunes Eda, C., Neubert, E. O. (2016). The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration. *Food Chemistry*, 197, 737–746.
- Vanneste, J. L., Cornish, D. A., Yu, J., Stokes, C. A. (2014). First Report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* the Causal Agent of Bacterial Canker of Kiwifruit on *Actinidia arguta* Vines in New Zealand. *Plant Disease*, 98:418.
- Vanneste, J. L., Yu, J., Cornish, D. A. (2011). Recent advances in the characterisation and control of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker on kiwifruit. *VII International Symposium on Kiwifruit*, 913:443-455.
- Walters, D. (2011). Plant Defense: Warding off attack by pathogens, herbivores and parasitic plants.
- Worldatlas. Top Kiwi-fruit Producing Countries In The World. Disponível em:
<<http://www.worldatlas.com/articles/top-kiwi-fruit-producing-countries-in-the-world.html>>
- Worldtopexports. Kiwifruit Exports by Country. Disponível em:
<<http://www.worldstopexports.com/kiwifruit-exports-by-country/>>